

**IN VITRO UNTERSUCHUNGEN
ZUR DIAGNOSTIK UND THERAPIE
PHOTOSENSIBILISierter BLASENTUMOREN**

WOLFRAM WEINSHEIMER

1985

*Thsa
München*

Aus der Urologischen Klinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. E. Schmiedt

In vitro Untersuchungen zur Diagnostik und Therapie
photosensibilisierter Blasen Tumoren

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfram Weinsheimer

aus
Augsburg

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr.med. D. Jocham

Mitberichterstatter: Prof.Dr.med. E. Schmiedt

Dekan: Prof.Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.3.1986

Inhaltsübersicht

A.	Einleitung	Seite 7
B.	Allgemeiner Teil	8
1.	Geschichtlicher Überblick	8
2.	Das Harnblasenkarzinom	11
2.1	Die Ätiologie des Harnblasenkarzinoms	12
2.2	Mikroskopische und makroskopische Anatomie der Harnblasentumoren	13
2.3	Die Diagnostik des Harnblasenkarzinoms	15
2.4	Die Therapie des Harnblasenkarzinoms	16
2.5	Das multifokale Wachstumsverhalten des Harnblasentumors	17
2.6	Zusammenfassung	19
3.	Die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Hämatoporphyrin- derivates	21
3.1	Der chemische Aufbau des Hämatopor- phyrinderivates	21
3.2	Hämatoporphyrinderivat - ein Gemisch aus vielen Komponenten	23
3.3	Die Mechanismen, die zur Anreicherung des HpD im Tumor führen	26
3.4	Die Mechanismen der Photosensibili- sierung durch HpD auf molekularer Ebene	32
3.5	Die Auswirkungen der Photoradiotherapie auf zellulärer Ebene	35
3.6	Die mutagene Wirkung der Lichtbestrahlung nach Photosensibilisierung mit HpD	37
3.7	Die Nebenwirkungen der Photoradiotherapie	40
3.8	Die physikalischen Eigenschaften des Hämatoporphyrinderivates	41
4.	Die Lichtquelle der Photoradiotherapie	44
4.1	Die Wirkungsweise eines Lasers	44
4.2	Die integrale Ausleuchtung von tumor- tragenden Hohlorganen mit Laserlicht	46
4.3	Die theoretischen Grundlagen der Lichtstreuung	48

	Seite
C. Spezieller Teil	51
5. Material und Methoden	51
5.1 Das Hämatoporphyrinderivat	51
5.1.1 Synthese des Hämatoporphyrinderivats (HpD)	51
5.1.2 Physikalische und chemische Untersuchung des synthetisierten Hämatoporphyrinderivats	52
5.1.3 Die verwendeten Tumormodelle	53
5.1.4 Die Extraktion von HpD aus dem Gewebe	54
5.1.5 Die Bestimmung der HpD-Konzentration	55
5.1.6 Die Auswertung der Meßergebnisse	58
5.2 Die Zellkulturversuche	60
5.2.1 Die verwendeten Zellkulturen und die damit verbundene Fragestellung	60
5.2.2 Die Zellkulturhaltung und Vorbereitung der Zellen zu den Bestrahlungsversuchen	61
5.2.3 Die zur Zellbestrahlung verwendete Lichtquelle	63
5.2.4 Die Laserbestrahlung der Zellen	65
5.2.5 Laserbestrahlung photosensibilisierter Zellen unter Verwendung von ^3H -Thymidin zur Vitalitätstestung	66
5.2.6 Untersuchungen zur fraktionierten Bestrahlung von Zellkulturen	68
5.2.7 Experimente zur HpD-Ausschleusung aus der Zelle, Vergleich zwischen gesunden und entarteten Zellen	69
5.2.8 Intrazelluläre HpD-Bestimmung mit Hilfe zeitaufgelöster und mikroskopischer Fluoreszenzmessung	71
5.3 Experimente zur Lichtstreuung	72
5.3.1 Experimente am Glasmodell einer Harnblase mit Intralipid ^R als Streumedium	72
5.3.2 Experimente mit abgewinkeltem Lichtleiter	75
5.3.3 Messungen zur Kohärenz der Lichtstreuung an Intralipid ^R	76
5.3.4 Die Wellenlängenabhängigkeit der Lichtstreuung durch Intralipid ^R	77

	Seite
6. Ergebnisse	78
6.1 Das Hämatoporphyrinderivat	78
6.1.1 Die physikalischen Eigenschaften des HpD	78
6.1.2 Die Pharmakokinetik des HpD, untersucht am transplantierten Brown-Pearce-Tumor	83
6.1.3 Die Pharmakokinetik des HpD, untersucht am nitrosamininduzierten Tumor der Ratte	88
6.2 Zellkulturversuche	93
6.2.1 Die Vitalität photosensibilisierter und nachfolgend bestrahlter Brown-Pearce-Zellen, ermittelt durch Trypan-Blau-Färbung	93
6.2.2 Experimente zur Zellverdopplungszeit von Brown-Pearce-Zellen	102
6.2.3 Die zytotoxische Auswirkung einer fraktionierten Bestrahlung	103
6.2.4 Der Vitalitätsverlauf photosensibilisierter Brown-Pearce-Zellen, ermittelt durch Markierung mit ^3H -Thymin	104
6.2.5 Ergebnisse der in-vitro-Bestrahlung von humanen Blasenkarzinomzellen im Vergleich zum Verhalten gesunder Urothelzellen nach Photosensibilisierung mit HpD	106
6.2.6 Dosiswirkungsvergleich der drei Zelllinien: Brown-Pearce-Zellen, gesundes Blasenurothel und Blasenkarzinomzellen	107
6.2.7 Versuchsergebnisse zur HpD-Ausscheidung aus der Zelle - Vergleich zwischen gesunden und entarteten Zellen	109
6.2.8 Vergleichende Untersuchungen von Brown-Pearce-Zellen und menschlichen Blasen-tumorzellen mit Hilfe der ^3H -Thymin-Markierung zur Vitalitätstestung	113
6.2.9 Vergleichende Zusammenfassung der in-vitro-Studien zur PRT; Nachweis eines "Schwarzschild"-Effektes bei der Durchführung der PRT	115
6.2.10 Ergebnisse der mikroskopischen, zeit-aufgelösten Fluoreszenzmessung an lebenden Zellkulturen	117
6.3 Das Streuverhalten von Intralipid R : Ergebnisse	124
6.3.1 Meßergebnisse zur Kohärenz des an Intralipid R gestreuten Lichtes	124

	Seite
6.3.2 Die Wellenlängenabhängigkeit der Lichtstreuung durch Intralipid ^R	126
6.3.3 Die optischen Eigenschaften eines plangeschnittenen sowie eines zu einer Spitze ausgezogenen Lichtleiterendes	127
6.3.4 Das Lichtstreuverhalten an Intralipid ^R im Glasmodell	131
6.3.5 Die Lichtstreuung, vermessen an einem abgewinkelten Lichtleiter	133
7. Diskussion	141
7.1 HpD-Konzentrationsbestimmung im Tumor und im gesunden Gewebe	141
7.2 Diskussion der in-vitro Bestrahlungsergebnisse an Zellkulturen	144
7.3 Diskussion der Versuchsergebnisse zur Lichtstreuung an Intralipid ^R	154
D. Zusammenfassung	158
E. Literaturverzeichnis	161

A. Einleitung

Hämatoporphyrinderivat (HpD) ist eine Substanz, die nach systemischer Verabreichung in entartetes Gewebe über Tage hin eingelagert wird. Aus dem gesunden Gewebe hingegen wird HpD nach systemischer Gabe innerhalb weniger Stunden eliminiert. Aufgrund dieser Eigenschaften und der dem HpD eigenen Fluoreszenz kann durch Verwendung der Substanz und einer entsprechenden Lichtquelle Tumorgewebe sichtbar gemacht werden.

HpD-speicherndes Gewebe ist gegenüber Licht photosensibilisiert. Licht mit geringer Leistungsdichte vermag derart photosensibilisiertes Gewebe zu zerstören. Die Eigenschaften des HpD erschließen somit neue Möglichkeiten einer gezielten Diagnose und Therapie von Tumoren.

In der vorliegenden Arbeit werden einige Teilaspekte eines neuen Diagnose- und Therapiekonzeptes unter Verwendung von Hämatoporphyrinderivat beim Harnblasenkarzinom untersucht:

1. Zytotoxische Wirkung einer Farbstofflaserbestrahlung auf Tumorzellen und vergleichbare gesunde Zellen, die mit HpD photosensibilisiert worden sind,
2. Nachweis und Quantifizierung der selektiven Anreicherung von Hämatoporphyrinderivat im Tumor gegenüber Normalgewebe,
3. mikroskopische und zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenzausbeute an lebenden Einzelzellen und
4. Entwicklung einer neuen Technik zur integralen, d. h. homogenen Laserlichtausstrahlung von tumortragenden Hohlorganen.

In einem allgemeinen Teil werden die theoretischen Grundlagen zur Diagnostik und Therapie HpD-behandelter Tumoren erläutert.

B. Allgemeiner Teil

1. Geschichtlicher Überblick

Erstmals im Jahr 1895 beschreibt RAAB die toxische Wirkung von Tageslicht auf Pantoffeltierchen, die mit Akridinphosphin bzw. Eosin photosensibilisiert worden waren (49). Weder das Tageslicht ohne photosensibilisierende Substanz, noch die Substanzen alleine zeigen einen vergleichbaren Effekt. In Weiterführung dieser Experimente versuchen von TAPPEINER und JESIONEK 1903 die Behandlung von Hauttumoren mit Eosin und Sonnenlicht (56). 1924 beschreiben POLICARD und Mitarbeiter eine Tumorfluoreszenz, die mit ultraviolettem Licht hervorgerufen werden kann (48). Verursacht war diese Erscheinung durch die Sekundärinfektion mit betahämolytisierenden Bakterien. Über gezielte Untersuchungen mit der Substanz Hämatoporphyrin, einem nichtmetallischen Abbauprodukt des Häm-Moleküls aus dem Hämoglobin, berichten AULER und BANZER im Jahr 1942 (3). Nach intramuskulärer Verabreichung eines künstlichen Porphyrins läßt sich mit einer ultravioletten Analyselampe eine deutliche Rotfluoreszenz insbesondere in den nekrotischen Bezirken von Tumoren aufzeigen. AULER und BANZER führen diese Arbeiten am Jobbling-Karzinom und am Jenson-Sarkom der Ratte sowie an menschlichen Hauttumoren durch. Erste Therapieversuche am Rattentumor mit Porphyrin und einer starken Quarzlampe müssen - bedingt durch den Krieg - abgebrochen werden. 1944 führt FIGGE umfangreiche Studien zur Konzentrationsanreicherung von Porphyrinen im Tumor durch (18).

Untersucht werden unterschiedliche Hämatoporphyrinderivate einschließlich der Metalloporphyrine. Fast alle dieser Porphyrine zeigen eine mehr oder weniger ausgeprägte Anreicherungstendenz im Tumor. Erste quantitative Analysen durch Messung der Fluoreszenz erfolgen. Im Jahr 1961 beschreibt LIPSON ein Hämatoporphyrinderivat (HpD), das eine um ein Vielfaches bessere Anreicherungstendenz im Tumor

aufweist als alle bisher bekannten Porphyrine (33). Hämatoporphyrinderivat wird aus Rinderhämoglobin über die Zwischenstufen Hämatoporphyrin durch Veresterung mit Eisessig-Schwefelsäure hergestellt. Bis zum Jahr 1964 untersucht LIPSON 50 Patienten mit Bronchial- bzw. Ösophaguskarzinom (36). Bis auf zwei Fälle weisen alle Tumoren nach systemischer Verabreichung von HpD eine deutliche Rotfluoreszenz auf. Es folgen Untersuchungen zur Fluoreszenz anderer Tumoren. Fluoreszenz nach systemischer HpD-Gabe kann nachgewiesen werden von LIPSON am Karzinom der Zervix 1964, von GREG am Uterus-Karzinom 1967, von GREGORIE an Plattenepithel- und Adenotumoren 1968, sowie von LEONARD und BECK 1971 am Plattenepithelkarzinom des Mundes, des Larynx, des Hypopharynx und der Trachea (13). Das Konzept einer Photoradiotherapie mit photosensibilisierenden Substanzen, die sich selektiv im Tumor anreichern, wird erstmals wieder von BELLIN 1961 aufgegriffen (12). Untersucht werden die Substanzen Eosin, Methylenblau, Thionin, Proflavin, Akridinorange und Neutralrot. 1972 beobachtet DIAMOND bei der Maus nach systemischer Gabe von Hämatoporphyrin Tumornekrosen an subkutan transplantierten Gliomen nach Bestrahlung mit weißem Licht (15). In den Jahren 1973/74 weist DOUGHERTY eine Wachstumsverlangsamung des subkutan implantierten Mammatumors der Maus nach Verwendung von Fluoreszin und grünem Licht nach (9). Ein Laser als Bestrahlungslichtquelle wird erstmals von TOMSON 1974 eingesetzt (58). Er bestrahlt epitheliale Mäusetumoren, die mit Akridinorange photosensibilisiert worden waren, mit dem grünen Licht eines Argon-Ionen-Lasers. Die therapeutische Verwendung von HpD in Verbindung mit Rotlicht wird von DOUGHERTY 1975 am subkutan implantierten Mammatumor bei Mäusen durchgeführt (10). Im Jahr 1975 untersucht KELLY die toxische Wirkung weißen Lichtes auf humanes Blasenkarzinom, das er auf immunsupprimierte Mäuse transplantiert und durch Gabe von HpD photosensibilisiert hat (27). 1978 setzt DOUGHERTY zum erstenmal einen rotlicht-emittierenden Farbstofflaser ein, nachdem nachgewiesen

worden war, daß im Hinblick auf eine ausreichende Gewebs-eindringtiefe für die Photoradiotherapie Licht mit einer Wellenlänge von mehr als 600 Nanometer erforderlich ist (10; 47).

Im Frühjahr 1979 beginnen die innovativen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe (Leitung D. JOCHAM) zur Diagnose und Therapie des Harnblasenkarzinoms.

2. Das Harnblasenkarzinom

Das derzeit in Europa und den USA stark an Häufigkeit zunehmende Blasenkarzinom ist beim Mann nach dem Prostatatumor die häufigste Neoplasie des Urogenitaltraktes. 5 % aller Geschwülste beim Mann und 1,5 % bei der Frau sind Harnblasenkarzinome. In den durch Krebs verursachten Todesfällen steht das Blasenkarzinom beim Mann an fünfter Stelle, bei der Frau an elfter Stelle. Die Erkrankungshäufigkeit steigt ab dem vierzigsten Lebensjahr kontinuierlich an, um etwa mit dem 65. Lebensjahr ihr Maximum zu erreichen.

2.1 Die Ätiologie des Harnblasenkarzinoms

Als Ursache des Blasenkarzinoms werden schon seit langem kanzerogene Stoffe diskutiert, die mit dem Urin ausgeschieden werden und deshalb direkt auf das Epithel der ableitenden Harnwege einwirken können. Dies erklärt auch, daß das Blasenkarzinom bevorzugt an Stellen auftritt, die am häufigsten und längsten mit dem Harn in Berührung kommen. Eine der wichtigsten präventativen Maßnahmen des Urologen im Hinblick auf das Harnblasenkarzinom ist es deshalb, Faktoren, die die Urinstase begünstigen, wie Blasendivertikel, Harnröhrenstrikturen oder das Prostata-Adenom rechtzeitig zu beseitigen.

Die lange Latenzzeit bis zum Auftreten der Erkrankung - man rechnet etwa 15 bis 30 Jahre - macht es schwierig, Kanzerogene als solche zu erkennen und nachzuweisen. Den ersten Zusammenhang in dieser Richtung erkennt Ludwig REHN 1895, der beobachtet, daß Arbeiter, die in der Anilinfabrik beschäftigt waren, außerordentlich häufig an Blasentumoren erkranken (50). Arbeitsmedizinisch spielt das Harnblasenkarzinom eine besondere Rolle bei Arbeiten mit Farbstoffen, Textilien, Leder und Gummi. Nach HOLTENHOFF und KIERFELD 1977/78 (30) sind nachfolgende Substanzen erwiesenermaßen kanzerogen oder zumindest daraufhin verdächtig:

Adlerfarn	Cyclomat	Tryptophan
Naphthylamin	o-Dianisidin	Zigaretten
2-Aminofluorid	Nitrosamine	Saccharin
Benzidin	o-Toluidin	Chlornaphazin
Coffein	Xenylamin	Phenazetin

2.2 Mikroskopische und makroskopische Anatomie der Harnblasentumoren

95 % aller Blasentumoren sind epithelialen Ursprungs. Histologisch lassen sie sich nach den Richtlinien der WHO von 1973 in sieben Gruppen differenzieren:

1. Übergangsepithelzellenpapillom: papillär angeordnetes Urothel ohne anaplastische Veränderungen, keine Infiltration
2. Übergangsepithelzellenpapillom, invertierter Typ: endophytisch wachsendes, papillär angeordnetes Urothel ohne anaplastische Veränderungen
- 3.1 Übergangsepithelzellenkarzinom Grad 1: geringe Anaplasie, Vermehrung der Zellagen über sieben, Polymorphie
- 3.2 Übergangsepithelzellenkarzinom Grad 2: noch eben papilläres Wachstum, Zellkerne vergrößert und etwa zur Hälfte mäßig hyperchromatisch
- 3.3 Übergangsepithelzellenkarzinom Grad 3: keine einheitliche Gewebsstruktur, über die Hälfte der Zellen polymorph und hyperchromatisch
4. Übergangsepithelzellenkarzinom mit Plattenepithel- und glandulärer Metaplasie
5. Plattenepithelkarzinom mit oder ohne Verhornung
6. Adenokarzinom
7. Undifferenziertes Karzinom

Die 5 % der nichtepithelialen Tumoren rekrutieren sich aus den Leiomyomen, Rhabdomyomen, Neurofibromen und Metastasen anderer Organe.

Klinisch werden die epithelialen Blasenkarzinome nach dem TNM-System wie folgt klassifiziert:

- T_x: Primärtumor nicht bestimmbar
- T₀: keine Evidenz für einen Tumor
- T_{is}: Carcinoma in situ
- T_A: papilläres nichtinvasives Karzinom
- T₁: keine Invasion über die Lamina propria hinaus
- T₂: Invasion der oberflächlichen Muskulatur
- T_{3a}: Invasion der tiefen Muskulatur
- T_{3b}: perforierende Invasion der Blasenwand
- T_{4a}: Invasion in Prostata, Uterus oder Vagina
- T_{4b}: Invasion in das Becken oder die Bauchwand

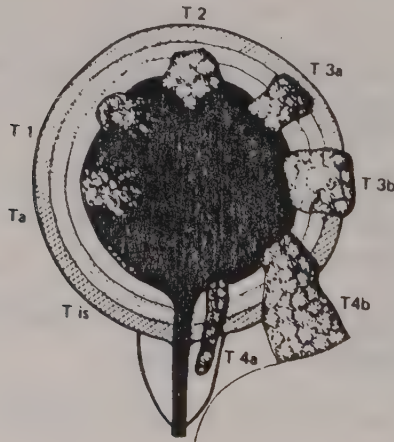


Abb. 1: Schematische Darstellung der T-Stadien des Harnblasentumors

2.3 Die Diagnostik des Harnblasenkarzinoms

Das häufigste Erstsymptom des Blasenkarzinoms, das in ca. 80 % der Erkrankung auftritt, ist die schmerzlose Hämaturie. Für den Urologen bedeutet das, daß er jeder Hämaturie so lange diagnostisch nachgehen muß, bis er einen Tumor mit Sicherheit ausschließen kann. Bei der Erkrankung des Blasenkarzinoms bestehen häufig Dysurie und Pollakisurie. Die weiterführende Diagnostik umfaßt nach gründlicher Anamnese und klinischer Allgemeinuntersuchung die Ausscheidungsurographie und die Urethrozystoskopie mit gleichzeitiger Gewinnung von Blasenspülflüssigkeit zur zytologischen Untersuchung. Bei eindeutig nachgewiesenem Tumor wird im Anschluß an die diagnostische Zystoskopie in gleicher Narkose die therapeutische Tumoresektion durchgeführt. An diese schließt sich unter Umständen das sog. Mapping, d. h. die Entnahme von Biopsien aus den verschiedenen Blasenquadranten an. Dieses Vorgehen ermöglicht eine erste Klassifizierung des diagnostizierten Tumors nach den T-Kategorien der TNM-Klassifikation. Neuerdings kann die Diagnostik ergänzt werden durch die extra- sowie intravesikale Sonographie. Den Lymphknotenbefall (N-Kategorie) versucht man mit der Ausscheidungsurographie, der Lymphographie und der Computertomographie zu erfassen. Die Aussagekraft der genannten Methoden ist beim Harnblasenkarzinom begrenzt, so daß oftmals zur weiteren Diagnostik die sogenannte Staging-Operation erforderlich ist. 60 % der tief infiltrierenden Tumoren ($T_3 - 4$) haben Metastasen, aber auch bereits Tumoren des Stadiums T_1 , also Tumoren, die noch nicht einmal die Muscularis erreicht haben, können in vereinzelt Fällen Metastasen aufweisen. Leber, Lunge, Pleura und Knochen sind am häufigsten von Metastasen befallen. Per continuitatem werden Rektum, Vagina, vordere und hintere Urethra, sowie der Penisschwellkörper erfaßt. Eine M-Klassifikation nach dem TNM-Schema erfordert deshalb gegebenenfalls neben der kompletten klinischen Durchuntersuchung die Röntgenuntersuchung

und Szintigraphie von Knochen und Leber sowie die Computertomographie.

2.4 Die Therapie des Harnblasenkarzinoms

Die Therapie des Blasentumors erfordert stadiengerechte Maßnahmen entsprechend der TNM-Klassifikation des Tumors. Wie bereits erwähnt, ist zur einwandfreien Diagnose die Urethrozystoskopie erforderlich, der sich gegebenenfalls schon in derselben Sitzung die transurethrale elektrische Resektion des Tumors anschließt. Mit einer elektrischen Schneideschlinge wird dabei schichtweise Tumorgewebe abgetragen. Die entnommenen Gewebestückchen werden anschließend histologisch untersucht. Wichtig ist die Beurteilung der Resektat-Basis bzw. -Ränder auf Tumorfreiheit, um eine sichere Aussage treffen zu können, inwieweit das tumoröse Gewebe entfernt werden konnte. Eine gegebenenfalls erforderliche Nachresektion erfolgt in der Regel fünf bis sieben Tage später. Ab dem Tumorstadium T₃ N₀ Grad 2 sowie bei häufig rezidivierenden Tumoren behandelt der Urologe den Karzinomkranken üblicherweise durch radikale Zystektomie mit anschließender suprapvesikaler Harnableitung.

Zunehmende Bedeutung gewinnt die Behandlung der Blasentumoren mit dem Neodym-YAG-Laser (54). Hierbei wird Laserlicht hoher Leistungsdichte transurethral über einen Lichtleiter in die Blase eingeleitet und gezielt auf den Tumor gerichtet. Vorteilhaft ist bei dieser Behandlung die berührungsfreie, tiefe und homogene Koagulation der gesamten Blasenwanddicke. Die Therapiemethode kann jedoch nur am makroskopisch erkennbaren Tumor angewendet werden.

Die systemische Verabreichung von Zytostatika wie Adriamycin^R, 5-Fluorouracil, Mitomycin C^R und cis-Platinum konnte bis zum heutigen Tag noch keine befriedigenden Therapieerfolge aufweisen. Ohne Zweifel einen Fortschritt in der Therapie

des Blasenkarzinoms stellt die lokale Anwendung von Zytostatika dar. Die intravesikale Instillation von Zytostatika wie Adriamycin^R oder Mitomycin C^R vermag die Rezidivhäufigkeit des Blasentumors deutlich zu senken. Vor allem trifft diese Therapiemaßnahme neben makroskopisch sichtbaren Tumoren auch mikroskopische Tumorzellnester, die sich den anderen Therapiemaßnahmen entziehen.

Auch die externe Hochvolttherapie ist als Monotherapie sehr umstritten. Das Blasenkarzinom ist wenig strahlensensibel, so daß 60 bis 80 Gy als Bestrahlungsdosis zur Therapie erforderlich sind. Bereits eine Bestrahlung mit 40 Gy kann den benachbarten Darm sowie die gesunde Blasenschleimhaut irreversibel schädigen. Die alleinige Anwendung einer Hochvolttherapie auf das Blasenkarzinom ist wegen dieser Darm- und Blasenschleimhautschädigung nicht sinnvoll. Der Wert einer im Rahmen einer notwendigen Zystektomie durchgeführten Vor- und Nachbestrahlung mit 20 bis 40 Gy ist gegenwertig umstritten.

Neue Perspektiven ergibt gegebenenfalls in Zukunft die Immuntherapie des Harnblasenkarzinoms. Neben dem Melanom ist es vor allem das Blasenkarzinom, an dem tumorspezifische Strukturmerkmale an der Tumorzelloberfläche nachgewiesen wurden. Durch Maßnahmen, die die Immunabwehr steigern, wie intratumorale BCG-Injektionen, Anwendung von Interferon-Induktoren oder KLH (keyhole limpet hemozyanin) sind Erfolge in der Therapie des Blasenkarzinoms beschrieben (32).

2.5 Das multifokale Wachstumsverhalten des Harnblasentumors

In 40 bis 60 % der Blasen Tumorfälle ist mit einem multifokalen Auftreten des Tumors zu rechnen (23; 57). Dieser Tatsache trägt der Urologe Rechnung, indem er nach Diagnosestellung eines Blasentumors die transurethrale sogenannte Quadrantenbiopsie durchführt. Neben Carcinoma in situ-verdächtigen Schleimhautarealen werden Biopsien aus dem Blasen-

trigonum, den Seitenwänden, der Hinterwand, dem Blasendach und der prostatistischen Harnröhre entnommen. Die Raten von 10 % Carcinomata in situ und 20 % Epithelotypie ungezielt biopsierter, zystoskopisch unauffälliger Blasenschleimhaut und eine dreimal höhere Rate solcher Veränderungen im Verlaufe dreimonatlicher Biopsien nach transurethraler Resektion eines Blasentumors rechtfertigen diesen Routineeingriff (57).

Therapeutisch bedeutet das multifokale Auftreten des Blasenkarzinoms ein großes Problem. Während makroskopische und damit sichtbare Tumoranteile reseziert werden können, entziehen sich die mikroskopischen Tumorzellnester weitestgehend der Tumorthherapie.

Die multifokale Wachstumstendenz des Blasentumors erklärt - zumindest zum Teil - die hohe Rezidivrate des Tumors nach transurethraler Resektion. Die Anwendung einer lokalen Zytostatika-Instillation senkt die Rezidivhäufigkeit des multifokal wachsenden Blasentumors.

Dennoch sind die Erfolge dieser therapeutischen Maßnahme aus zwei Gründen nicht sehr hoch:

1. Zur Vermeidung einer Schädigung der gesunden Blasenschleimhaut kann das Zytostatikum nicht in der notwendigen hohen Dosierung verwendet werden,
2. führen die Zytostatika aufgrund ihrer lokalen, kanzerogenen Potenz auf die Blasenschleimhaut per se zu Tumorzidiven.

Solange die beim Blasentumor zur Anwendung gelangenden Therapiemaßnahmen nicht selektiv die mikroskopischen wie makroskopischen Tumoranteile des multifokal wachsenden Blasenkarzinoms ausreichend schädigen, läßt sich die hohe Rezidivrate des Blasentumors nicht befriedigend senken.

Die Tatsache des multifokalen Wachstums des Blasenkarzinoms, insbesondere im mikroskopischen Bereich, führt dazu, daß die

bislang verwendeten Methoden zur Behandlung dieser schweren Erkrankung größtenteils nur Palliativmaßnahmen darstellen können.

2.6 Zusammenfassung

Die Prognose des Blasenkrebses ist aus vielerlei Gründen sehr schlecht. Die Symptomarmut der Krankheit erschwert die rechtzeitige Diagnose und damit therapeutische Interventionen, so daß trotz vieler Fortschritte der Diagnostik und Therapie in den letzten Jahren die radikale Zystektomie bei vielen Blasentumorkranken nach mehrmaliger TUR und Laserbestrahlung ein unvermeidbarer therapeutischer Eingriff ist. Die daraus resultierende Notwendigkeit einer suprapubesikalen Harnableitung zieht eine erhöhte Infektionsgefährdung beider Nieren nach sich. Eine chronische Infektion beider Nieren wiederum kann zum Nierenversagen führen. Neben dieser schwerwiegenden Gefährdung des Blasenkarzinomkranken durch die Zystektomie sollte nicht vergessen werden, welche große Belastung die suprapubesikale Harnableitung insbesondere für den alten Menschen darstellt. Die Indikationstellung der Zystektomie ist aus den erwähnten Gründen einerseits sehr streng zu stellen, andererseits erzwingt die Notwendigkeit einer radikalen Tumorthherapie diesen belastenden und verstümmelnden Eingriff am Blasenkarzinomkranken.

Die hohe Rezidivquote nach transurethraler Resektion und Laserbestrahlung erklärt sich vor allem aus der Eigenart des Blasentumors, multilokulär zu wachsen. Während die makroskopisch sichtbaren Tumoranteile mit der elektrischen Schlinge und dem Laser zerstört werden können, entziehen sich die häufig zusätzlich vorhandenen mikroskopischen Tumornester dieser Therapie.

Es wird deutlich, daß das heutige Therapiekonzept des Blasentumors nicht befriedigt. Zur Verbesserung der Heilungschancen sind prinzipiell zwei Angriffspunkte möglich:

1. Die Diagnostik des Blasenkarzinoms wird verfeinert, so daß durch die Früherkennung des Tumors der Kranke in einem für die Therapie günstigen Stadium behandelt wird.
2. Die Therapiemethode wird so verbessert, daß gezielt die makroskopischen wie die mikroskopischen Tumoranteile getroffen werden, ohne große Schädigung der gesunden Harnblasenanteile.

Hämatoporphyrinderivat (HpD) reichert sich nach intravenöser Gabe im Tumor an. Gesundes Gewebe ist zwei Tage nach HpD-Gabe im Gegensatz zum Tumor wieder HpD-frei. Infolge der Eigenschaft von HpD, unter geeignetem Anregungslicht zu fluoreszieren, ist die Substanz als optischer Tumormarker geeignet. Eine Frühdiagnose des Blasenkarzinoms nach Gabe von HpD sollte mit dem Zystoskop in Verbindung mit entsprechendem Anregungslicht möglich sein.

Hämatoporphyrinderivat photosensibilisiert Gewebe gegenüber Licht bestimmter Wellenlängen. Die Ausnutzung dieser Eigenschaft in Verbindung mit der Tendenz zur selektiven Anreicherung im Tumor läßt das HpD zur Therapie des Blasenkarzinoms geeignet erscheinen. Erforderlich für die Behandlung des Blasentumors ist somit eine Lichtquelle, die Licht geeigneter Wellenlänge und Leistungsdichte transurethral auf den Tumor einwirken läßt. Das therapeutisch nutzbare Licht muß eine Wellenlänge aufweisen, die einerseits eine hohe Eindringtiefe des Lichts in das Gewebe gewährleistet, andererseits im Absorptionsmaximum von HpD liegt. Erst mit Entwicklung eines Farbstofflasers in den letzten Jahren steht eine für die Therapie des Blasentumors geeignete Lichtquelle zur Verfügung. Somit sind die technischen Voraussetzungen gegeben, im Experiment das Konzept der Diagnose und Photoradiotherapie des Blasenkarzinoms mit HpD und Laserlicht zu erarbeiten.

3. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Hämatoporphyrinderivates

3.1 Der chemische Aufbau des Hämatoporphyrinderivates

Als Porphin bezeichnet man ein Molekül, das aus vier Pyrrol-
ringen besteht, die über Methingruppen miteinander verbunden
sind.

Porphin

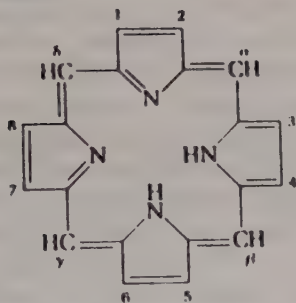


Abb. 2: Die molekulare Struktur des Porphins

Die Substitution der Wasserstoffionen am Pyrrolring führt zu den Porphyrinen. Die Porphyrine werden nach ihren Seitenket-
tensubstituenten benannt, wobei die in der Natur am weite-
sten verbreiteten Porphyrine die Protoporphyrine sind.
Diese enthalten als Substitution vier Methyl-, zwei Vinyl-
und zwei Propriensäurereste. Durch unterschiedliche Aufein-
anderfolge der Substituenten lassen sich rein theoretisch 15
isomere Protoporphyrine bilden. In der Natur findet sich
jedoch nur das Protoporphyrin IX. Hämoglobin, Myoglobin und
die Mehrzahl der Cytochrome sind daraus aufgebaut.

Protoporphyrin kann mit Metallionen - im Falle des Hämoglobinmoleküls dem zweiwertigen Eisen - einen Chelat-Komplex bilden. Diese Verbindung heißt Häm. Werden die Seitenketten-substituenten mit Essigsäure verestert, so entsteht das Hämatoporphyrin.

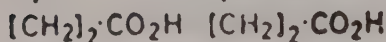
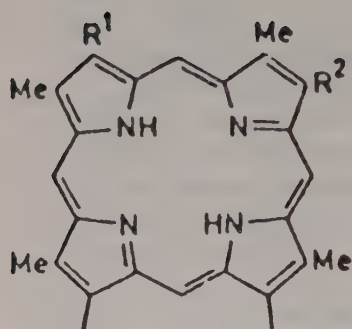
Das Porphinskelett enthält 11 sogenannte konjugierte Doppelbindungen, die für die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Moleküls von Bedeutung sind. Unter konjugierten Doppelbindungen wird eine Kette von Kohlenstoffatomen verstanden, die alternierend von Einfachbindungen und Doppelbindungen zusammengehalten wird. Ein derartiges System ist fähig zur Mesomerie: Die für die Doppelbindung zwischen zwei Kohlenstoffatomen verantwortlichen Elektronen verharren nicht stabil zwischen den beiden C-Atomen, sondern schwingen ständig zwischen mehreren Atomen hin und her. Die Doppelbindung wird zur Einfachbindung, und die benachbarte Einfachbindung wird zur Doppelbindung. Die Extrema der Schwingungszustände der Elektronen heißen mesomere Grenzzustände. Diese sind durch einen hohen Energiegehalt gekennzeichnet. Die Schwingungscharakteristik der Elektronen wird durch den elektromagnetischen Einfluß der Porphyrinsubstituenten verändert. Diese Tatsache ist zur Identifizierung der unterschiedlichen Porphyrinmoleküle geeignet. Das Porphyrinmolekül ist durch Einwirkung von Licht in den höher energetischen Grenzzustand zu versetzen, der jedoch höchstens 10^{-8} Sekunden andauert. Danach gibt das Molekül die Energie wieder ab. Zwei Formen des Energietransfers sind möglich: Entweder als Lichtemission - Fluoreszenz genannt - oder in Form einer photochemischen Reaktion. In der photochemischen Reaktion reagiert das Molekül entweder unmittelbar mit einem Nachbarmolekül, oder es gibt seine Energie an ein Sauerstoffmolekül ab. Es entsteht Singulett-Sauerstoff.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, daß das HpD ein Molekül ist, das Lichtenergie aufnehmen kann und photochemisch umsetzt oder in Form von Fluoreszenz wieder abgibt. Die

emittierte Fluoreszenz des HpD besitzt entsprechend den Porphyrinsubstituenten eine spezielle Wellenlängencharakteristik, die sich zur Identifizierung des Moleküls heranziehen läßt. Mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektrophotometrie kann das HpD nachgewiesen werden. Befinden sich im Analysenmaterial jedoch mehrere unterschiedliche Porphyrine, so überlagern sich die jeweiligen Fluoreszenzcharakteristiken der Einzelmoleküle. Der HpD-Nachweis wird dadurch erschwert und läßt sich nur noch nach Voranschaltung geeigneter Extraktionsverfahren mit Hilfe der Spektrophotometrie erbringen.

3.2 Hämatoporphyrinderivat - ein Gemisch aus vielen Komponenten

Im Jahr 1960 entwickelt LIPSON ein Verfahren, das die Herstellung von HpD ermöglicht. Durch Veresterung von Hämatoporphyrin, einem Abbauprodukt des Rinderhämoglobin, mit einem Eisessig-Schwefelsäuregemisch im Verhältnis 19 : 1 entsteht das Hämatoporphyrinderivat, eine Substanz mit hoher tumorspezifischer Einlagerung (34). Ausgedehnte langjährige Untersuchungen des HpD ergeben, daß die von LIPSON beschriebene Veresterung zu einem Porphyringemisch führt, das aus vielen Einzelkomponenten besteht. Im Jahr 1981 gelingt BONNETT die Reindarstellung der zehn Hauptkomponenten des HpD-Gemisches durch Anwendung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (4). Es lassen sich dabei folgende Einzelsubstanzen identifizieren:



- (1) $R^1 = R^2 = CH(OH)Me$
- (2) $R^1 = CH(OH)Me$; $R^2 = CH(OAc)Me$
- (3) $R^1 = CH(OAc)Me$; $R^2 = CH(OH)Me$
- (4) $R^1 = CH=CH_1$; $R^2 = CH(OH)Me$
- (5) $R^1 = CH(OH)Me$; $R^2 = CH=CH_2$
- (6) $R^1 = R^2 = CH(OAc)Me$
- (7) $R^1 = CH=CH_2$; $R^3 = CH(OAc)Me$
- (8) $R^1 = CH(OAc)Me$; $R^2 = CH=CH_2$
- (9) $R^1 = R^2 = CH=CH_2$
- (10) $R^1 = R^2 = CH(CH_2)_3CO_2H$

Abb. 3: Die molekulare Struktur von Hämatoporphyrinderivat und seinen Seitenkettensubstituenten

Hämatoporphyrinderivat ist ein außerordentlich komplexes Substanzgemisch. Die einzelnen Porphyrine weisen unterschiedliche biologische Eigenschaften auf, und erst das Zusammenspiel aller Porphyrinkomponenten des HpD charakterisiert dessen biologisches und pharmakokinetisches Verhalten.

Für den Untersucher stellt sich das Problem, daß die einzelnen HpD-Chargen sich nicht exakt in ihrer Zusammensetzung gleichen, so daß die Reproduzierbarkeit von Experimenten erschwert ist. So gilt heute das Hauptinteresse der HpD-Forschung der Verbesserung der HpD-Herstellung im Hinblick auf eine Substanz, die in ihrer Zusammensetzung allen klinischen Ansprüchen genügt. Dazu müssen die Einzelsubstanzen des HpD

in ihrer biologischen Eigenschaft erfaßt werden. Wie komplex diese Arbeit ist, soll im folgenden an Beispielen verdeutlicht werden:

DOUGHERTY analysiert im Jahr 1982 die Einzelkomponenten des HpD durch die Anwendung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und der Gelfiltration (14). An einem auf Mäuse subkutan transplantierten Tumor untersucht er die biologische Aktivität der einzelnen Porphyrine nach systemischer Verabreichung und Anwendung von Rotlicht. DOUGHERTY differenziert durch Gelfiltration das HpD in stabile Porphyrinaggregate, instabile Porphyrinaggregate und Porphyrinmonomere. Die biologische Aktivität scheint, wie DOUGHERTY an seinem Tumormodell zeigt, im polymerisierten Anteil der Porphyrine zu liegen. Die Fraktion der polymerisierten Porphyrine ist etwa 1,5 bis 2mal wirksamer als das Substanzgemisch HpD. Eine dünn-schichtchromatographische Analyse der polymerisierten Fraktion ergibt, daß sich die Polymerisationsprodukte größtenteils von Hydroxyvinyldeuteroporphyrin ableiten. Die Größe der polymerisierten Porphyrine entspricht etwa dem Albumin. Mit der HPLC werden acht Komponenten isoliert. Hämatoporphyrin geht dabei in zwei Diastereoisomere über, ebenso zerfällt Hydroxyvinyldeuteroporphyrin in Strukturisomere. Diese Produkte besitzen keine biologische Aktivität mehr. Allerdings weisen die anderen sechs Komponenten der HPLC-Analyse biologische Wirksamkeit auf. Diese Komponenten machen jedoch nur einen geringen Anteil der Gesamtmenge des HpD im Substanzgemisch aus. KESSEL ermittelt die Aktivität der HpD-Einzelkomponenten, indem er diese durch die Verbindung zweier dünn-schichtchromatographischer Trennmethode isoliert und anschließend an Leukämiezellen in Verbindung mit Licht austestet. Als Zytotoxizitätsparameter verwendet er dabei die Inhibition des Cycloleucintransportes durch die Zellmembran. Dünn-schichtchromatographie I besteht aus 65 % Methanol und 35 % Benzol auf silicatbeschichteten Platten, Dünn-schichtchromatographie II aus 2,6 Glutidin : Propylenglycol : Wasser (4 : 21 : 75) auf

Talkumplatten in Ammoniakatmosphäre. Mit der Chromatographie I läßt sich HpD in die Komponenten A, B und C trennen. Fraktion A trennt sich in System II in insgesamt 4mal 8 Komponenten. Fraktion C mit Chromatographie II in drei Komponenten, welche auch bei der Analyse von kommerziellem Hämatoporphyrin mit System II gefunden werden können. Die Polarität der gefundenen Einzelkomponenten wird durch ihre Löslichkeit in einem Oktanol/Wassergemisch ermittelt. Dabei werden folgende Verteilungskoeffizienten gefunden (je größer, desto unpolarer).

Fraktion A: 0,8;	Hp: 1;	HpD: 1,8
Fraktion B: 1,7;	Fraktion C: 6;	Mesoporphyrin: 12
Mesoporphyrindimethylester: 90;	(28).	

Zusammenfassend kann aus dem Ergebnis für die eigenen Experimente festgestellt werden: Laut chromatographischer Analyse besteht Hämatoporphyrin (Hp) und Fraktion C aus denselben Einzelkomponenten, die jedoch in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen. Die Löslichkeitseigenschaften der beiden Porphyringemische differieren um den Faktor 6. Allein dieser Unterschied im Löslichkeitsverhalten, der durch Veränderung der Konzentrationen einzelner Porphyrine im Substanzgemisch hervorgerufen werden kann, läßt erwarten, daß die pharmakokinetischen Eigenschaften eines Substanzgemisches wie HpD außerordentliche Schwankungen aufweisen können, sowie die Konzentrationen der Einzelkomponenten nicht ganz exakt konstant gehalten werden können.

3.3 Die Mechanismen, die zur Anreicherung des HpD im Tumor führen

In vielen experimentellen Arbeiten wurde versucht, die Mechanismen, die für die selektive Anreicherung des HpD im tumorösen Gewebe verantwortlich sind, zu klären. Im wesent-

lichen bieten sich zwei Methoden des HpD-Nachweises aus dem Gewebe an, mit denen aber, bedingt durch ihre noch zu beschreibenden Eigenarten und damit verbundenen Nachteile, die pharmakokinetischen Mechanismen des HpD bis zum heutigen Tag nicht eindeutig geklärt werden konnten. Die eine Nachweismethode basiert auf den optisch-physikalischen Eigenschaften des HpD. Mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektrofluorometrie läßt sich das HpD im Gewebe quantitativ analysieren. Mit geeignetem biochemischem Verfahren wird zunächst versucht, das HpD aus dem Gewebe möglichst vollständig zu extrahieren. Das Ziel des biochemischen Extraktionsverfahrens ist eine durchsichtige Lösung, die mit einem Photometer oder Fluoreszenz-Spektrophotometer vermessen werden kann. Es liegt nahe, daß mit dieser Nachweismethode neben dem interessierenden HpD einige andere organische Gewebsstoffe wie Hämoglobin, Myoglobin und Cytochrome miterfaßt werden, welche ebenfalls Porphyrine enthalten. Mit Hilfe der Fluoreszenzphotometrie gelingt es zumindest teilweise, speziell die Porphyrine zu erfassen; die im HpD enthalten sind, sowie die störenden Porphyrine auszublenden. Die andere Methode des HpD-Nachweises beinhaltet die radioaktive Markierung des HpD-Moleküls. Verwendet wird üblicherweise ^3H oder ^{14}C . Im Jahr 1967 zeigte WINKELMANN, daß erhebliche Unterschiede in den Meßdaten zwischen ^{14}C - und ^3H -markierten Tetraphenylporphyrinsulfat (TPPS) bestehen, was sich vor allem mit dem chemischen Austausch des Tritiums im Rahmen des Porphyrinstoffwechsels erklären läßt (60).

Mit dem Nachweis von Isotopen kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die gemessenen Isotope nicht mittlerweile verstoffwechselt wurden, also im Speziellen das zu untersuchende Porphyrin abgebaut ist, und damit letztendlich ein biologisch unwirksames Produkt vermessen wird. Insbesondere bei der Verwendung von Tritium muß außerdem noch der starke intermolekulare Protonenaustausch berücksichtigt werden.

Aus den genannten Gründen werden bei den eigenen Arbeiten ausschließlich fluorometrische Methoden verwendet. Durch geeignete Techniken wird versucht, die methodisch bedingten Störfaktoren gering zu halten.

Die meisten Aussagen über pharmakokinetische Mechanismen sind mit Isotopen ermittelt worden. Trotz der genannten Vorbehalte der Anwendung radioaktiver Methoden gegenüber, erscheinen viele dieser gewonnenen Ergebnisse recht zuverlässig, da sie mit den Erfahrungen anderer experimenteller Verfahren gut in Einklang zu bringen sind. Nach DOUGHERTY stimmt die Konzentration von fluorometrisch vermessenem HpD im Gewebe mit ^3H - bzw. ^{14}C -markiertem HpD weitestgehend überein (12). Am transplantierten Mammatumour zwölf Wochen alter, weiblicher DBA/2 HA-DD Mäuse weist DOUGHERTY HpD-Konzentrationsspitzen von $4,1 \pm 1,34 \mu\text{g}$ pro Gramm analysiertem Gewebe 48 Stunden nach systemischer HpD-Gabe von 10 mg pro kg Körpergewicht nach. Im gleichen Experiment macht er deutlich, daß insbesondere die Leber, aber auch die Niere und die Milz das HpD stark anreichern. Die Konzentrationspitzen treten dabei drei bis vier Stunden nach intraperitonealer HpD-Gabe auf. Den Konzentrationspitzen in diesen Geweben schließt sich während der nächsten 48 Stunden ein etwas niedrigeres Plateau an. Die HpD-Konzentration in Muskel und Haut liegt deutlich niedriger als die Tumorkonzentration. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang der Vergleich mit einer 1975 von DOUGHERTY erschienenen Arbeit, worin er am selben Tumormodell unter denselben Versuchsbedingungen mit fluorometrischen Methoden ermittelte Konzentrationen des HpD im Tumor angibt (10). 24 Stunden nach intraperitonealer HpD-Gabe beschreibt DOUGHERTY eine Tumorkonzentration von $42 \pm 4 \mu\text{g}$ HpD pro kg Körpergewicht. Insgesamt läßt sich an diesem Beispiel schon die Problematik zur quantitativen HpD-Bestimmung aus dem Gewebe aufzeigen. BUGELSKY, PORTER und DOUGHERTY berichten 1981 über den Konzentrationsverlauf von ^3H -Hp und ^3H -HpD (7). Drei Stunden nach HpD-Gabe zeigen die Hepatozyten der

Leber eine niedrigere HpD-Konzentration. Die Leberkapsel bzw. die von Kupffer'schen Zellen in den Lebersinusoiden weisen hohe HpD-Konzentrationen auf. 12 bis 24 Stunden nach HpD-Gabe ist die HpD-Konzentration in den Hepatozyten deutlich weiter abgefallen, während in der Kapsel und insbesondere in den von Kupffer'schen Zellen der HpD-Spiegel bis 48 Stunden konstant bleibt. Die Milz zeigt drei Stunden nach HpD-Gabe eine homogene Konzentrationsabnahme in der weißen Pulpa auf die Hälfte des anfangs vorhandenen HpD-Spiegels, wohingegen in der roten Pulpa und der Milzkapsel die Konzentration konstant bleibt. Auch im Magen behält die Mukosa und die Submukosa die HpD-Konzentrationen bei, während die Konzentrationen in der Muskularis nach 24 Stunden absinken. Die Haut zeigt nach 48 Stunden niedrigere HpD-Konzentrationen in der Epidermis, wohingegen die Dermis höhere Gewebesspiegel besitzt. Im SMT-F-Tumor, einem Mammatumors der Maus, entwickelt sich zwischen drei und 48 Stunden nach intraperitonealer HpD-Gabe ein Stroma/Tumorzellgradient mit dem Faktor 5. Die Konzentrationen bleiben in diesem Zeitraum weitestgehend konstant. Zwischen 72 und 168 Stunden nach HpD-Gabe vergrößert sich die Konzentrationsdifferenz zwischen Stroma und Tumor entsprechend der Tumorzellproliferation. Auffallend ist bei dieser Untersuchung, daß in den Makrophagen das HpD besonders hoch konzentriert ist. Die Zuverlässigkeit der HpD-Bestimmung mit Isotopen wurde unter anderem fluoreszenzmikroskopisch überprüft.

Zusammenfassend stellt BUGELSKY fest, daß sich die Parenchymzellen nichtentarteten Gewebes entsprechend der Serum-Clearance (HpD-Halbzeit etwa drei Stunden) von HpD klären, während Makrophagen und andere Zellen des retikuloendothelialen Systems HpD speichern. Unabhängig vom Konzentrationsverlauf des HpD im Blut akkumuliert HpD im Tumorstroma bis 48 Stunden nach HpD-Gabe. Fünf bis sieben Tage nach HpD-Verabreichung zeigen Tumorzellen verminderte HpD-Konzentrationen, wohingegen die Stroma-Konzentration an HpD in tumorösem Gewebe konstant bleibt.

Folgende Beobachtungen geben Hinweise für mögliche Mechanismen: Gewebe, in denen die vaskuläre Permeabilität für Serum-Proteine erhöht sind, weisen sehr hohe und langandauernde HpD-Konzentrationen auf. Ebenso besitzen das retikuloendotheliale System bzw. Gewebe mit einem hohen Anteil an Serumproteinen entsprechend hohe HpD-Konzentrationen. Dies erklärt sich aus der starken Protein-Bindung der Porphyrine. Weiterhin dürfte die ineffiziente Lymphdrainage neoplastischen Gewebes eine Ursache für die HpD-Anreicherung im Tumor sein.

BUGELSKY findet bei seinen eigenen in-vitro-Experimenten an Zellkulturen keine vermehrte HpD-Aufnahme bei entarteten Zellen gegenüber nicht entarteten Zellen (7). Dahingegen wird in Arbeiten von MOSSMAN und CARRANO (46) eine bevorzugte Anreicherung von HpD in entarteten Zellen beschrieben. KESSEL beschreibt 1981 in-vitro-Studien an Leukämiezellen, in denen er differenzierte Angaben zur Porphyrinaufnahme der Zellen macht. Die biologische Wirksamkeit der Porphyrine wird ermittelt, indem die Zellkulturen mit einer Porphyrinkonzentration inkubiert werden, die bei 50 % der getesteten Zellen nach Bestrahlung mit Licht die Cycloleucin-Aufnahme blockiert. Außerdem wird die intrazelluläre Porphyrinkonzentration fluorometrisch ermittelt. Als Ergebnis seiner Arbeiten streicht KESSEL heraus, daß die Pharmakokinetik der Porphyrine von ihrem Löslichkeitsverhalten in Wasser geprägt wird. Mit dünnenschichtchromatographischen Methoden trennt KESSEL sowohl Hämatoporphyrin (Hp) als auch Hämatoporphyrinderivat (HpD) auf. Dabei wird deutlich, daß das Substanzgemisch HpD mehr hydrophobe Porphyrinanteile hat als Hp. Diese hydrophoben Porphyrine machen jedoch nur wenige Prozent der Gesamtmenge an Porphyrinen aus. Nur hydrophobe Porphyrine können die Zellmembran passieren und damit intrazellulär in Verbindung mit Licht wirksam werden. In Konsequenz dieser Tatsache testet KESSEL die Zytotoxizität des Mesoporphyrins, einem stark hydrophoben Porphyrin. In der Tat erweist sich in vitro Mesoporphyrin beim Vergleich extrazellulärer Por-

phyrinkonzentrationen wirksamer als HpD oder Hp. Andererseits erbringt aber der Vergleich intrazellulärer Porphyrinkonzentrationen, daß die biologische Wirksamkeit von Mesoporphyrin wesentlich geringer ist, als die von HpD oder Hp. In Verbindung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (28; 46) ergeben sich folgende Arbeitshypothesen:

Nur die hydrophoben Anteile des Porphyringemisches können in die Zelle eindringen und sie gegenüber Licht photosensibilisieren. Hydrophobe Porphyrine werden jedoch von serumhaltigen Medien im Zellkulturversuch leicht wieder ausgewaschen. Ebenso ist anzunehmen, daß die Blutperfusion der Organe in vivo das hydrophobe Porphyrin wieder auswaschen kann. Die Porphyrinretention in der Zelle beruht deshalb, wie KESSEL 1982 zeigt (29) auf einer intrazellulären Biotransformation - vermutlich im Sinne einer Hydrierung - der hydrophoben Porphyrinanteile. Diese intrazelluläre Reaktion bewirkt, daß die nunmehr hydrophilen Porphyrine die Zelle nicht mehr verlassen können und photobiologisch aktiv werden. Es ist nicht geklärt, ob Tumorzellen diesen intrazellulären Hydrierungsprozeß in stärkerem Maße vollziehen als gesunde Vergleichszellen, so daß noch offen steht, ob die Tumorselektivität der Porphyrinanreicherung durch diese von KESSEL beschriebenen Reaktionsmechanismen erklärt werden kann. MOAN und CHRISTENSON bestätigen in einer Arbeit aus dem Jahr 1982 durch Anwendung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), daß die hydrophoben Porphyrinanteile die photochemisch wirksamen Anteile des HpD sind (45). Die Identifikation dieser hydrophoben Porphyrine ergibt unter anderem Protoporphyrin als eine Komponente. KESSEL hat in seiner Arbeit 1982 am subkutan implantierten Sarkom der Ratte festgestellt, daß reines Protoporphyrin im Gegensatz zu HpD keine fluorometrisch nachweisbare Konzentrationsanreicherung im Tumor nach intraperitonealer Gabe zeigt. Aus den Arbeiten von MOAN (45) und KESSEL (29) geht hervor, daß die tumorselektiven photosensibilisierenden Eigenschaften der Porphyrine nicht durch einzelne reine Porphyrine gewährleistet

werden, sondern, daß erst ein Substanzgemisch, wie z. B. das HpD die entsprechenden, für eine Photoradiotherapie erforderlichen pharmakokinetischen und optobiochemischen Eigenschaften besitzt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Mechanismen, die eine tumorselektive Anreicherung des HpD verursachen, noch weitestgehend unbekannt sind. Durch hydrophobe Porphyrinderivate läßt sich in vitro eine starke Photosensibilisierung hervorrufen. Die tumorselektive Photosensibilisierung mit reinen hydrophoben Porphyrinen gelingt nicht.

Die Ursache für die höhere Porphyrinkonzentration im Tumorgewebe gegenüber dem gesunden Gewebe nach systemischer Porphyringabe liegt nach Meinung der Mehrzahl der Autoren nicht in zellgebundenen Mechanismen. Denkbar wären als Mechanismen der tumorselektiven HpD-Anreicherung eine vermehrte Gefäßpermeabilität für Eiweiße im Tumorgewebe oder eine verminderte Lymphdrainage des Tumors.

3.4 Die Mechanismen der Photosensibilisierung durch HpD auf molekularer Ebene

Bereits 1927 stellt GAFFRAN fest, daß Hämatoporphyrin, aber auch Chlorophyll, in Verbindung mit Licht zum Abbau von Purinen und Harnsäure zu Allantoin führt (20). Ebenso läßt sich eine Photooxidation der Stoffe Tyrosin und Methionin, induziert durch Hp und Licht nachweisen. Spätere kinetische Studien an Methionin in Verbindung mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen führen zu der Überlegung, daß die Hämatoporphyrin-vermittelte Photooxidation eine chemische Reaktion ist, in der über die Anregung des Hämatoporphyrins Sauerstoff in einen reaktionsfreudigen Zustand versetzt wird (17). Im Jahr 1967 zeigt SPIKES die Bedeutung des Singulett-Sauerstoffs, eines höherenergetischen Anregungszustandes des Sauerstoffmoleküls, bei lichtvermittelten Reaktionen in Verbindung mit Photosensibilisierern (52). Grundsätzlich

sind nach SPIKES zwei Wege der Photoreaktion möglich, die er wie folgt beschreibt:

Durch Licht wird das Photoagens (z. B. HpD) in den kurzlebigen Singulett-Zustand überführt, von welchem aus das Molekül in den längerlebigen Triplet-Zustand übergeht. Von hier aus setzt sich die Photoreaktion auf zwei unterschiedlichen Wegen fort:

1. Durch Wasserstoffionen- oder Elektronentransfer kommt es zur Bildung reaktionsfreudiger Radikale bzw. Redoxreaktionen,
2. durch Energietransfer bildet sich Singulett-Sauerstoff, welcher seinerseits weiterreagieren kann.

Singulett-Sauerstoff zersetzt im Rahmen einer photooxidativen Reaktion das Bilirubin. Da sich Bilirubin und insbesondere eine Bilirubinabnahme sehr gut mit dem Photometer durch seine Absorption bei 451 nm nachweisen läßt, eignet sich diese photooxidative Reaktion hervorragend als Indikator für entstehenden Singulett-Sauerstoff. Beta-Carotin hemmt Singulett-Sauerstoff-vermittelte Reaktionen. GRANELLI und DIAMOND nutzen im Jahr 1975 diese Tatsachen zum Nachweis von Singulett-Sauerstoff als Reaktionsprodukt von unterschiedlichen Porphyrinderivaten und Licht (16). In Verbindung mit Zellkulturen zeigen sie, daß die Menge freier Singulett-Sauerstoffs bei der photooxidativen Reaktion von Porphyrin und Licht direkt mit der zytotoxischen Wirkung von Porphyrinderivat und Licht auf Zellkulturen korreliert. DOUGHERTY beschreibt 1976 genauere Energiebetrachtungen zur lichtvermittelten Photoreaktion (11). Mit 1,3 -diphenylisobenzofuran als Indikator für den Singulett-Sauerstoff kann er die eingesetzte Lichtenergie zur Singulett-Sauerstoffbildung in Beziehung setzen. DOUGHERTY beobachtet dabei, daß ein Lichtquant aus Hämatoporphyrin in Äthanol $0,75 \pm 0,07$ Moleküle freisetzt, wohingegen bei gleicher Konstellation in der

Einzelzelle eines Mäusemammatumors nur $0,16 \pm 0,07$ Moleküle frei werden. Dies legt die Vermutung nahe, daß die Zelle einen Schutzmechanismus gegen Photooxidationen durch Unterdrückung von Singulett-Sauerstoff besitzt.

In einer Arbeit von ANDREONI 1982 ergeben sich Erkenntnisse zur Frage eines möglichen biphotonischen Prozesses des HpD-Zerfalls durch Verwendung eines gepulsten Lasers (2). ANDREONI mißt die Fluoreszenzausbeute an HpD in Relation zur eingestrahlten Lichtenergie eines Lasers mit gepulster Emission:

Die Zerstörungswahrscheinlichkeit P des HpD korreliert mit dem Quadrat der einwirkenden Laserenergie (P = HpD-Konzentrationsverminderung, verursacht durch einen Laserimpuls, dividiert durch die HpD-Gesamtkonzentration vor diesem Laserimpuls). Diese Gesetzmäßigkeit läßt den Schluß auf einen biphotonischen Zerfall des HpD zu. Erhärtet wird diese Vermutung durch die Beobachtung, daß eine Zellkultur, die mit HpD photosensibilisiert ist, auf gepulstes Laserlicht sensibler reagiert als auf kontinuierliche Laserbestrahlung. Dies erklärt sich wie folgt:

Im Fall der ungepulsten Laserbestrahlung wird Singulett-Sauerstoff frei; im Fall der gepulsten Bestrahlung ergibt sich zusätzlich zu der Produktion des Singulett-Sauerstoffs noch die Möglichkeit, daß das HpD mit dem ersten einfallenden Photon in den Triplet-Zustand versetzt wird, um anschließend durch die Aufnahme eines zweiten Photons in ein Radikal überzugehen und direkt biochemisch wirksam zu werden. Diese Reaktion hat eine größere Zytotoxizität als die einfache Freisetzung von Singulett-Sauerstoff.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Lichtexposition eines Porphyrins zur Bildung von Singulett-Sauerstoff führen kann, welcher nach derzeitigem Kenntnisstand eine große Rolle bei den therapeutisch nutzbaren Photoreaktionen spielt. Es ist jedoch auch direkte Radikalbildung des Porphyrins bei der lichtinduzierten chemischen Reaktion von Bedeutung.

3.5 Die Auswirkungen der Photoradiotherapie auf zellulärer Ebene

Hauptangriffspunkte der Photoradiotherapie sind die zellulären Proteine. Folgende funktionelle Gruppen spielen hierbei eine Rolle: Die Thiolgruppe der Cysteine, der nichtprotonierte Imidazolring des Histidins, die Thioäthergruppe des Methionins, der Indolring des Tryptophans sowie das Phenolat-Anion des Tyrosins. Die Aminosäuresequenz innerhalb der Proteine ist von großer Bedeutung. FRANZONE beschreibt 1978, daß eine bestimmte Aminosäurefolge das entsprechende Polypeptid vollständig vor der schädigenden Wirkung einer Photoradiotherapie schützt, während die Umstellung der Aminosäuresequenz den Verlust dieses Schutzes zur Folge hat (19). Weiterhin wird gezeigt, daß Licht mit der Wellenlänge von 435 nm in Verbindung mit Hämatoporphyrin Lysozyme zerstört, während Licht mit der Wellenlänge von 367 nm unwirksam ist. Ungebundenes Hp in wässriger Lösung absorbiert Licht mit der Wellenlänge von 367 nm. Das Lichtabsorptionsmaximum verschiebt sich durch die Bindung des Hp an Proteine zu einer Wellenlänge von 435 nm. Aus diesen Beobachtungen folgt, daß Lysozym eine spezifische Porphyrinbindungsstelle besitzt. Durch selektive Anregung der gebundenen Porphyrine mit Licht entsteht die zerstörende Wirkung auf die Lysozyme. Nicht an das Protein gebundenes Porphyrin ist bei Anregung mit dem entsprechenden Licht wirkungslos. Dieses Experiment unterstreicht die Theorie, daß nicht nur Singulett-Sauerstoffvermittelte Reaktionen bei den phototoxischen Effekten eine Rolle spielen.

Weitere molekulare Angriffspunkte stellen nach KESSEL ungesättigte Fettsäuren dar (31). Die photobiologischen Reaktionen mit Zellkernstrukturen, insbesondere mit der DNS, werden noch im folgenden Abschnitt 3.6 behandelt.

Auf zellulärer Ebene wirkt die porphyrinvermittelte Photoradiotherapie vorwiegend auf die Zellmembran. Beschrieben

werden Permeabilitätsänderungen der Membran neben Inhibition verschiedener Membrantransportmechanismen sowie Kreuzreaktionen verschiedener Membranproteine (42).

Desweiteren wirkt die Photoradiotherapie (PRT) im Zytoplasma: Neben Schäden an den Enzymen der Mitochondrien und der Entkoppelung und Inhibition der oxidativen Phosphorylierung wird die Hemmung von Mikrosomen beobachtet (31). Die Schädigung lysosomaler Membranen kann zur Zytolyse führen. 1981 untersucht CHRISTENSON photodynamische Effekte an Zellen mit synchronisiertem Zellzyklus (42): Während der mitotischen Zellteilung werden die Zellen durch die PRT in der Metaphase blockiert. Dies spricht für eine Störung der Polymerisation der Proteine, die zur Spindelbildung während der Mitose notwendig ist (42). Im Rahmen der fraktionierten Bestrahlung photosensibilisierter Zellen beobachten MOAN und CHRISTENSON, daß eine Fraktionierung der Lichtbestrahlung umso wirksamer ist, je höher die angewandte Dosis bei der Erstbestrahlung ist (39). Eine Erklärung für diesen Effekt könnte sein, daß bei der Erstbestrahlung die Membranpermeabilität für Porphyrine lichtdosisabhängig gesteigert wird, und damit bei weiteren Bestrahlungen mehr Porphyrin in der Zelle vorhanden ist. Im Ablauf des Zellzyklus synchronisierter Zellen ist die Photoradiotherapie während der Synthese der DNS (S-Phase des Zellzyklus) am wirksamsten (44). Diese Erkenntnis könnte zum Schluß verleiten, daß die DNS-Synthese empfindlicher Angriffspunkt der Bestrahlung sein kann. Weiterführende Untersuchungen führen allerdings zu der Überlegung, daß aufgrund der zyklusabhängigen Instabilität der Kernmembran, die in der Mitte der S-Phase ihr Maximum erreicht, auch hier membranspezifische Bestrahlungseinflüsse diskutiert werden müssen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Membranstrukturen der Zelle die Organellen sind, die am empfindlichsten auf die Photoradiotherapie reagieren. Molekulare Angriffspunkte sind vorwiegend Proteine und damit viele

Enzyme. Die Einflüsse auf die oxydative Phosphorylierung läßt Auswirkungen der PRT auf die Cytochrome vermuten. Desweiteren werden ungesättigte Fettsäuren geschädigt.

3.6 Die mutagene Wirkung der Lichtbestrahlung nach Photosensibilisierung mit HpD

Bereits im Frühjahr 1927 untersucht BÜNGELER eingehend die mutagene Wirkung von subkutan injiziertem Hämatoporphyrin unter Einwirkung von Licht (6). Dabei geht er von der Beobachtung aus, daß alte Menschen, die einen Hauttumor entwickeln, häufig erhöhte Konzentrationen an Hämatoporphyrin im Urin aufweisen. Die Experimente führt BÜNGELER ausschließlich an weißen Mäusen durch. Verwendung findet salzsaures, kristallines Hämatoporphyrin in schwach alkalischer Lösung. 240 Mäuse werden wöchentlich zweimal mit 50 µg subkutan injiziertem Hp behandelt. Anschließend werden die Versuchstiere täglich fünf Stunden intensiver Sonnenbestrahlung ausgesetzt. Bereits nach Erstbelichtung kann eine Reizkonjunktivitis mit Blepharospasmus, sodann eine Rötung der ganzen Haut beobachtet werden. Nach einigen Tagen entwickeln sich Blasen, die in Ulzerationen übergehen. Die Tiere werden erregt und entwickeln Streckkrämpfe. In diesem ersten Stadium sterben einige Versuchstiere. Die Sektion ergibt eine starke Hyperämie der Bauchorgane und serösen Häute mit Einblutungen. Die Tiere, die dieses erste Stadium überleben, durchlaufen eine gewisse Gewöhnung, bevor sie das zweite Stadium der Schädigung erreichen. Dieses ist gekennzeichnet durch Hautatrophie, Hautwucherungen, Mastzellinfiltration und Hyper- bzw. Parakeratosen, die etwa zwei Monate nach Behandlungsbeginn auftreten. Stadium III, das etwa im dritten Monat nach Versuchsanfang beginnt, ist gekennzeichnet durch hyperplastische Hautprozesse und Geschwulstbildung an allen lichtexponierten Stellen. An Geschwülsten werden hauptsächlich Papillome und Plattenepithelkarzinome sowie

Spindelzellsarkome gefunden. Die maligne Entartung wird ab dem 5. Monat nach Versuchsbeginn beobachtet. Metastasierung wird beschrieben. Untersuchungen auf innere Organschäden ergeben degenerative Veränderungen und Amyloidosen hauptsächlich an Milz und Nieren. Zudem können Hämosiderosen beobachtet werden. Die erheblichen chronischen Veränderungen bis hin zur malignen Entartung geben Anlaß, die mutagene Potenz der Photoradiotherapie genauer zu untersuchen. Bei seinen Experimenten verwendet BÜNGELER sehr hohe Porphyrinkonzentrationen. Bei der Dosierung des Hämatoporphyrins von zweimal wöchentlich 50 µg in Form einer subkutanen Injektion ist das Hp mindestens um den Faktor 10 konzentrierter als die maximal beobachteten HpD-Gewebsspiegel im gesunden Gewebe bei klinischer Anwendung der Photoradiotherapie. Die Versuchstiere werden einer chronischen Lichtexposition ausgesetzt, die - insbesondere wegen ihres UV-Lichtanteiles - für sich alleine bereits Entartung hervorrufen kann. Diese - bei konstantem Reiz einer chronischen Hämatoporphyrin- und Lichtexposition grundsätzlich nachweisbare-mutagene Potenz der PRT wurde in späteren Experimenten eingehend untersucht. 1980 beschreibt GOMER Untersuchungen über DNS-Schäden an Ovarialzellen des Hamsters. Anwendung finden in ihrer zytotoxischen Wirkung vergleichbare Dosen einer Gamma-Bestrahlung bzw. Photoradiotherapie. Mit Hilfe der Chromatographie wird die Menge der DNS bestimmt, deren Doppelhelix aufgebrochen ist. In diesen Experimenten führt die Gamma-Bestrahlung zu einer deutlich höheren Schädigung der DNS als die PRT. Desweiteren wird die Regenerationsfähigkeit der DNS nach Bestrahlung ermittelt. Es ergeben sich diesbezüglich keine Unterschiede zwischen PRT und Gamma-Bestrahlung. Jedoch vermögen hohe Dosen einer angewandten PRT Polymerasen zu inaktivieren und damit Reparaturmechanismen empfindlich zu stören (21). Ähnliche Versuche zu Chromosomenschäden nach PRT beschreibt im Jahr 1980 MOAN (41). Auch hier wird die Wirkung von ionisierenden Strahlen mit der einer PRT an Zellkulturen verglichen. Analysiert werden die

nach Behandlung auftretenden DNS-Abbrüche, der Austausch zwischen homologen Chromatiden bzw. das Auftreten von alkalilabilen Bruchstellen. MOAN findet, daß die Therapie mit ionisierenden Strahlen etwa fünfmal so viel Austausch zwischen homologen Chromatiden und etwa 80 % mehr Chromosomenabbrüche verursacht als die Anwendung einer PRT.

Die Untersuchungen zur Mutagenität der Photoradiotherapie lassen den Schluß zu, daß vergleichbare, klinisch etablierte Tumorthérapien ein wesentlich höheres Entartungsrisiko haben als die Anwendung von HpD und Licht. Unabhängig von der beschriebenen mutagenen Wirkung zeigt die PRT einige Auswirkungen auf die Chromosomen, die zum Zelltod führen. Es fällt auf, daß Guanin besonders empfindlich gegenüber der PRT ist (43). Weiterhin wird von MOAN beschrieben, daß der im Rahmen der PRT freiwerdende Singulett-Sauerstoff zu alkalilabilen Chromosomenabbrüchen führt, die nach LÜCKE-HÜHLE den Zelltod zur Folge haben (37). Chromosomenabbrüche können von der Zelle innerhalb 15 Minuten repariert werden, wenn nicht die entsprechend erforderlichen Enzyme durch die Anwendung des PRT mitgeschädigt sind. Im Rahmen der zytotoxischen Wirkung der PRT spielt jedoch der Einfluß auf genetisches Material - wie bereits aufgeführt - nur eine untergeordnete Rolle.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die PRT wie die meisten anderen Behandlungsmaßnahmen bösartiger Neubildungen mutagene Potenz besitzt, die jedoch, verglichen insbesondere mit der Strahlentherapie, wesentlich geringer einzuschätzen ist. Sonstige Einflüsse der PRT auf genetisches Material sind gering. Obwohl auch auf dieser Ebene zytotoxische Auswirkungen zu diskutieren sind, liegt der Hauptangriffspunkt der PRT an anderer Stelle, insbesondere der Zellmembran (siehe Abschnitt 3.5).

3.7 Die Nebenwirkungen der Photoradiotherapie

Neben der klinisch nicht relevanten Mutagenität der PRT können einige Nebenwirkungen auftreten, die sich jedoch durch Vermeiden einer zu starken Sonnenlichtexposition bis zu einem Monat nach HpD-Gabe völlig verhindern lassen. Bei unkontrollierter Sonnenlichtexposition während dieses Zeitraumes entsprechen die Auswirkungen des injizierten HpD einer Porphyrie, am ehesten vergleichbar der in der Klinik bekannten Porphyria cutanea tarda. Klinisch zeigen sich bei Lichtexposition an den belichteten Stellen Hautrötung, in Extremfällen Blasen und Erosionen. Weiterhin wird Hyperpigmentierung beobachtet. Eine Konjunktivitis, die als Extremform bis zum Blepharospasmus führen kann, läßt sich durch Tragen entsprechender Schutzbrillen völlig verhindern. Ergänzend erwähnenswert ist noch die Potenz des Hämatoporphyrins als Psychoparmakon (6). Von BRUCATO wird beschrieben, daß die depressive Komponente, die durch Barbiturate ausgelöst wird, durch Gabe von Hp antagonisiert werden kann. Aus der neurologischen Klinik akut intermittierender Porphyrien sind die Polyneuropathie mit peripheren Lähmungen, die Neuritis nervi optici sowie psychotische Veränderungen bekannt, jedoch finden sich in der Literatur über PRT keinerlei Hinweise auf Beobachtungen dieser Art, so daß anzunehmen ist, daß die verwendeten HpD-Konzentrationen zu niedrig sind, um neurologische Erscheinungen induzieren zu können.

Es bleibt zusammenfassend festzustellen, daß die Nebenwirkungen der Photoradiotherapie unter Verwendung von HpD durch entsprechende Maßnahmen, insbesondere einen geeigneten Lichtschutz gering gehalten werden können.

3.8 Die physikalischen Eigenschaften des Hämato- porphyrinderivates

Hämatoporphyrinderivat absorbiert wie alle Porphyrinderivate Licht, also elektromagnetische Strahlung bestimmter Wellenlänge. Licht breitet sich bekanntlich nicht kontinuierlich aus, sondern in Form von Lichtkorpuskeln, den sog. Photonen. Der Energiegehalt eines Photons errechnet sich aus $h \cdot \nu$, mit dem Planckschen Wirkungsquantum h ($6,62 \cdot 10^{-34}$ Js) und der Lichtfrequenz ν . Die Fähigkeit eines Moleküles, Photonen zu absorbieren, ist davon abhängig, daß das Photon einen ganz bestimmten Energiegehalt, also das absorbierte Licht eine ganz bestimmte Frequenz bzw. Wellenlänge aufweist. HpD kann Licht mit fünf verschiedenen, aber für HpD charakteristischen Wellenlängen absorbieren. Diese Absorptionsmaxima, die, wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, geringfügige Schwankungen, abhängig von den Seitenkettensubstituenten des Porphyrins, aufweisen, ergeben sich für HpD etwa wie folgt:

395; 497; 529; 567 und 621 Nanometer.

Die zugehörigen Extinktionskoeffizienten (als Maß für die pro Mol HpD absorbierte Lichtmenge) ergeben sich nach GOMER dazu mit 100,5; 9,807; 5,980; 4,186 und 2,631 (21).

Das bedeutet, daß HpD bei ca. 400 nm stark absorbiert, aber auch Licht mit einer Wellenlänge von ca. 620 nm von HpD noch aufgenommen werden kann. Die Anregung von HpD erfolgt mit den Wellenlängen der Absorptionsmaxima des HpD. Die Energie wird dabei von einigen Elektronen aufgenommen. Diese Anregung erfolgt äußerst schnell, d. h. in weniger als 10^{-15} Sekunden. Für das weitere Schicksal des HpD gibt es zwei Möglichkeiten. Wie bereits beschrieben, kann das angeregte Molekül photochemisch weiterreagieren, oder es gibt die Energie in Form von Fluoreszenz wieder ab. Die Fluoreszenz-emission angeregten HpD geschieht in weniger als 10^{-8} Sekunden mit einer Wellenlänge, die aus energetischen Gründen

länger ist, als die des Anregungslichtes. Auch dieses emittierte Licht ist für das Molekül charakteristisch. Hämatorporphyrinderivat hat ein Fluoreszenzmaximum bei ca. 630 nm; d. h. angeregtes HpD emittiert Rotlicht. Diese Wellenlänge bleibt konstant, unabhängig davon, ob das Porphyrin mit Licht einer Wellenlänge von 395, 497, 529 oder 567 angeregt wird. Die Wellenlängencharakteristik sowohl der Absorption, wie auch der Emission, wird durch mehrere Faktoren deutlich verschoben:

1. Beeinflussen die Seitenkettensubstituenten die Schwingungscharakteristik der Porphyrine,
2. liegt Hp sowie HpD nicht als Einzelkomponente vor, sondern als Porphyringemisch. Je nach Zusammensetzung ergeben sich für Hp oder HpD deutliche Unterschiede in den Absorptions- bzw. Emissionscharakteristiken und
3. verschiebt die Bindung der Porphyrine an Proteine die Absorptions- und Emissionsmaxima (siehe Abschnitt 3.5).

Diese Tatsache der Wellenlängenverschiebung der Absorptions- und Emissionsmaxima hat einige praktische Konsequenzen. Das HpD, das im Gewebe vorliegt, hat andere Wellenlängencharakteristiken als HpD in wässriger Lösung bzw. Zellkulturmedium, das unter Umständen noch mit fötalem Kälberserum versetzt ist. Dies muß bei der fluorometrischen Bestimmung des HpD im jeweiligen Einzelfall berücksichtigt werden. In den eigenen Experimenten kann außerdem beobachtet werden, daß unter Alterungsprozessen - trotz Lagerung bei -20 °C im Dunkeln - derartige Wellenlängenverschiebungen ebenfalls auftreten. Daraus läßt sich folgern, daß sich die Zusammensetzung des HpD altersabhängig verändert.

Zusammenfassend ergeben sich aus der Kenntnis der optophysikalischen Daten des HpD folgende wesentliche Tatsachen:

1. Mit Licht angeregtes HpD fluoresziert mit einer Wellenlänge von ca. 630 nm, emittiert also rotes Licht,
2. die maximale Fluoreszenzausbeute läßt sich durch Anregung des HpD mit blauem Licht von ca. 400 nm Wellenlänge erzielen. Licht dieser Wellenlänge wird von HpD am stärksten absorbiert und induziert deshalb auch am stärksten die photobiochemischen Reaktionen des HpD,
3. HpD absorbiert auch Licht mit ca. 630 nm Wellenlänge. Die Gewebeeindringtiefe von Licht ist wellenlängenabhängig. Nach PETERSON (1977) kann nur Licht mit einer Wellenlänge von mehr als 600 nm tief in das Gewebe eindringen. In Konsequenz hieraus folgt, daß der Absorptionspeak des HpD bei ca. 630 nm für eine Photoradiotherapie mit entsprechender Tiefenwirkung im Tumor heranzuziehen ist (47).

4. Die Lichtquelle der Photoradiotherapie

Die Eigenschaft von Gewebe, nur Licht mit einer Wellenlänge von mehr als 600 nm ausreichend tief penetrieren zu lassen, erfordert bei der Anwendung der PRT mit dem Photosensibilisierer HpD, das relative Absorptionsmaximum des HpD von 630 nm zu nutzen, um eine ausreichende Tiefenwirkung der Therapiemethode zu erzielen (47). Zur Geringhaltung der Nebenwirkungen sollte mit möglichst geringer Lichtenergie gearbeitet werden. Dies ist möglich, wenn das therapeutische Licht eine Wellenlängencharakteristik hat, die weitestgehend deckungsgleich ist mit der Absorptionscharakteristik des HpD bei 630 nm.

Das Fehlen einer entsprechenden Lichtquelle sowie eines Konzeptes zur homogenen Ausstrahlung der Harnblase zur Erfassung des multifokalen Blasen tumors ließen KELLY und SNELL 1976 an der klinischen Realisierung einer Anwendung der PRT beim menschlichen Blasenkarzinom scheitern (27).

Erst die Entwicklung moderner Lasertechnologie ermöglicht die erfolgreiche Weiterentwicklung des Therapiekonzeptes einer Photoradiotherapie beim menschlichen Blasenkarzinom.

4.1 Die Wirkungsweise eines Lasers

Die Bezeichnung LASER steht für Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, d. h. Lichtverstärkung durch angeregte Emission von Strahlung.

Den ersten Hinweis auf die Möglichkeit einer Strahlungsverstärkung durch stimulierte Emission findet sich in einer Arbeit von Albert EINSTEIN aus dem Jahre 1917. Das erste funktionsfähige Gerät (MASER), das auf diesem Prinzip der stimulierenden Emission beruht, bauen im Jahr 1954 die Amerikaner TOWNES, GORDIN und ZEIGER. Angeregt werden Ammoniakmoleküle; die emittierte Strahlung hat eine Wellenlänge von 1,25 cm.

Im Jahr 1960 gelingt es Th. H. MAIMANN, den ersten Verstärker dieser Art für Licht zu entwickeln. Mit Xenonblitzen wird Licht in einen Rubinstab gepumpt, der an beiden Enden parallel verspiegelt ist. Damit wird ein Teil der Rubinmoleküle in einen angeregten Zustand versetzt. Die Rückkehr der Moleküle in den Grundzustand erfolgt nicht wie sonst durch spontane Lichtemission, sondern stimuliert durch eine den Rubinstab durchlaufende Lichtwelle. Dadurch ist die Lichtemission phasenrichtig mit der stimulierenden Lichtwelle und verstärkt diese. Durch Reflexion an den Stabenden entsteht so eine stehende Welle, von der ein Teil durch den an einem Ende halbdurchlässigen Spiegel nach außen durchtreten kann.

Auf dem gleichen Prinzip beruht die Wirkungsweise eines Gas-Lasers. Ein langes Glasrohr, gefüllt mit Gas, ist mit zwei parallelen Glasplatten verschlossen. Durch hochfrequenten Wechselstrom, der über entsprechende Elektroden in der Röhre ein elektrisches Feld aufbaut, werden die im Rohr befindlichen Ionen und Elektronen beschleunigt. Bei ihrem Zusammenstoß mit den Gasmolekülen geben sie ihre kinetische Energie an diese ab. Durch angeregte Lichtemission verlieren diese Gaspartikel ihre Energie wieder in Form von Licht. Diese Lichtemission ist in Phase mit der stimulierenden Lichtwelle, so daß eine entsprechende Lichtverstärkung erfolgt.

Im Rahmen der Photoradiotherapie findet ein Farbstofflaser Verwendung. Mit einem Argon-Ionen-Laser wird ein Laserstrahl auf das in Flüssigkeit gelöste und mit einer Hochdruckpumpe zu einem flachen Strahl fokussierte RhodaminB-Perchlorat gelenkt. Zwischen einem entsprechenden Spiegelsystem kann der Farbstoff selbst zum Lasen angeregt werden. Das Laserlicht eines Farbstofflasers unterscheidet sich grundlegend von dem anderer Lasersysteme. Das von einem Gas-Laser emittierte Licht setzt sich aus einigen monochromatischen Linien zusammen, die durch die möglichen Energieniveaus der in den Gasatomen angeregten Elektronen bestimmt sind. Die Energie

eines Moleküls setzt sich nicht nur aus der Energie seiner Elektronen, sondern auch aus Rotations- und Schwingungsenergie zusammen. Anstelle des Linienspektrums ergibt sich beim Farbstoff-Laser nicht monochromatisches, sondern Licht mit einer gewissen Wellenlängenstreuung. Die Anwendung von Rhodamin B-Perchlorat erbringt hierbei eine Lichtemission mit einer Wellenlänge von ca. 630 nm. Die Lichtausgangsscharakteristik des verwendeten Farbstoff-Lasers entspricht damit weitgehend dem Absorptionsspeak des HpD bei 630 nm. Damit steht eine bezüglich der Anregungscharakteristik des HpD ideale Lichtquelle für die Photoradiotherapie zur Verfügung (24).

4.2 Die integrale Ausleuchtung von tumortragenden Hohlorganen mit Laserlicht

Die Eigenart des Blasentumors, gehäuft multifokal zu wachsen, erfordert ein Therapieverfahren, das Tumoren in allen Abschnitten der menschlichen Harnblase erfassen läßt. Das Prinzip der tumorselektiven Photosensibilisierung mit HpD ermöglicht die gezielte Therapie aller Blasen-Tumoranteile, auch der bislang nicht erkennbaren bzw. therapierbaren mikroskopischen Anteile, sofern es gelingt, die menschliche Harnblase homogen mit dem zur Therapie erforderlichen Licht auszustrahlen.

Die Bedingungen für das therapeutische Licht lassen sich dabei wie folgt zusammenfassen:

1. Das Licht muß eine Wellenlänge von ca. 630 nm aufweisen,
2. das Licht muß so fokussiert sein, daß es sich ohne größere Leistungseinbußen transurethral in die menschliche Harnblase einleiten läßt,

3. das in der Blase verfügbare Licht muß an jedem Punkt der Harnblaseninnenwand eine Leistung aufweisen, die zur völligen Zerstörung photosensibilisierter Tumoren ausreicht,
4. das Licht darf an keinem Punkt der Harnblaseninnenwand Leistungsdichten überschreiten, die zur Schädigung nicht photosensibilisierten gesunden Blasenurothels führen können.

Die beiden ersten Bedingungen werden in idealer Weise von einem Farbstoff-Laser erfüllt.

Für Bedingung drei und vier ist es erforderlich, das Licht, das sich mit Hilfe eines Lichtleiters transurethral in die Harnblase leiten läßt, dort so zu streuen, daß es mit möglichst konstanter Leistungsdichte alle Punkte der Harnblaseninnenwand erreicht.

Mit Hilfe einer Fetteemulsion läßt sich Licht streuen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden erstmals Messungen zur Lichtstreuung therapeutischen Laserlichtes am Harnblasenmodell durchgeführt (8).

Neben den noch zu erläuternden physikalischen Eigenschaften erfordert die klinische Anwendung eines Streumediums die Erfüllung zweier klinischer Voraussetzungen:

1. Das Streumedium muß sterilisierbar und klinisch absolut unbedenklich, d. h. bei seiner Anwendung nebenwirkungsfrei sein.
2. Die klinische Anwendbarkeit einer Streusubstanz erfordert eine leichte und billige Verfügbarkeit des verwendeten Mittels.

Diese Bedingungen sind bei der für die eigenen Experimente verwendeten Fetteemulsion erfüllt, da es sich um ein Präparat handelt, das im Rahmen der Infusionstherapie bereits breite Anwendung findet.

4.3 Die theoretischen Grundlagen der Lichtstreuung

Aus dem plangeschnittenen Ende eines Lichtleiters tritt das Laserlicht kegelförmig in Verlängerung des Lichtleiters aus. Durch Einbringen von winzigen Teilchen in diesen Lichtkegel läßt sich das Licht nach allen Seiten hin streuen, wobei gewisse Bedingungen für diese Streupartikel gewährleistet sein müssen.

1. Das Licht darf im Rahmen der Streuung an den Partikeln in seiner Wellenlängencharakteristik nicht verändert werden,
2. die Streupartikel dürfen nicht zur Beugung des Lichtes führen, denn diese hätte Interferenzen und damit eine partielle Auslöschung des Lichtes zur Folge und
3. die Moleküle des Streumediums dürfen das Licht nicht absorbieren.

Eine Lichtstreuung, die weder zur Wellenlängenverschiebung, noch zur Absorption des Lichtes führt, nennt man kohärente Streuung oder Rayleigh'sche Streuung, benannt nach dem englischen Physiker und Nobelpreisträger. Er analysierte die Streuung von Licht an kolloidalen Teilchen genauer und postulierte die vier Bedingungen, die ein Medium zur kohärenten Lichtstreuung haben muß:

1. Die einzelnen Teilchen des Streumediums sind nahezu kugelförmig,
2. die Teilchen des Streumediums absorbieren selbst kein Licht,
3. der Teilchendurchmesser der Streuteilchen muß klein sein gegenüber der Wellenlänge des zu streuenden Lichtes und

4. die Verteilung der Streuteilchen muß statistisch verteilte lokale Dichteunterschiede aufweisen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Fette­mul­sion genügt diesen Bedingungen nur teilweise. Die einzelnen Fetttröpfchen einer Fette­mul­sion sind aufgrund der Oberflächenspannung kugelförmig, womit die erste der Bedingungen erfüllt ist. Durch die Brown'sche Molekularbewegung bedingt, liegt keine homogene Verteilung der Fetttröpfchen vor. Die vierte Rayleigh'sche Bedingung eines statistisch verteilten Dichteunterschiedes der Partikel ist damit erfüllt. Über die Absorptionsverhältnisse der Fette­mul­sion gegenüber der verwendeten Wellenlänge müssen Experimente Auskunft geben. Der Durchmesser der einzelnen Fetttröpfchen liegt bei der verwendeten Fette­mul­sion im Nanometerbereich. Ohne experimentelle Bestätigung ist keine Aussage darüber zu treffen, ob die Tröpfchendurchmesser/Wellenlängen-Relation der Rayleigh'schen Forderung genügt.

In der Folge ist zu überlegen, mit welchen Experimenten die offenen Fragen zur Rayleigh'schen Streuung beantwortet werden können. Mit Hilfe einer geeigneten Anordnung wird das Streuverhalten einer Fette­mul­sion in Abhängigkeit von ihrer Verdünnung mit Wasser untersucht. Die absorbierte Lichtenergie wird näherungsweise ermittelt. Bei den eigenen Experimente zeigt sich eine gewisse Absorption, so daß weiterführende Untersuchungen erforderlich werden. Dazu ist die Überlegung anzustellen, in welcher Form die Fettmoleküle die Lichtenergie - als unerwünschten Nebeneffekt - aufnehmen bzw. abgeben können. Drei theoretische Wege sind gegeben:

1. Die absorbierte Lichtenergie führt zur Anregung der Fettmoleküle, die in Form von Fluoreszenz, also Licht größerer Wellenlänge als der des Anregungslichtes, abgegeben wird,

2. die absorbierte Lichtenergie führt zu Rotations- oder Schwingungsänderungen der Moleküle, was wiederum das Auftreten einer Raman-Streuung zur Folge hat, die charakterisiert ist durch Streulicht mit Wellenlängen, die sowohl größer als auch kleiner als die des Anregungslichtes sein können und
3. die Fettmoleküle werden mit Hilfe der Lichtenergie biochemisch verändert.

Zur Abklärung der ersten beiden Möglichkeiten werden im Rahmen der eigenen Arbeit Experimente durchgeführt, wobei mit Hilfe der Fluoreszenzspektrophotometrie die Streuung auf ihre Wellenlängencharakteristik hin untersucht wird. Der dritte Punkt erfordert umfangreiche biochemische Analysen, die von der eigenen Arbeitsgruppe nicht durchgeführt werden. Geeignete Untersuchungen sind geplant.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß sich Licht unter Anwendung einer geeigneten Streusubstanz theoretisch so streuen ließe, daß die Forderung nach einer homogenen Ausstrahlung der menschlichen Harnblase zur Therapie des multifokal wachsenden Blasen tumors unter Verwendung des tumorselektiven Photosensibilisierers HpD erfüllt sein müßte. Der klinische Einsatz des Streumediums erfordert, daß die Substanz auf ihre klinischen Nebenwirkungen hin bereits untersucht ist. Im Rahmen der eigenen Experimente wird deshalb mit einer Fette mulsion gearbeitet, die in der Infusionstherapie bereits seit längerem verwendet wird, so daß klinische Erfahrungen vorliegen.

C. Spezieller Teil

5. Material und Methoden

5.1 Das Hämatoporphyrinderivat

5.1.1 Synthese des Hämatoporphyrinderivates (HpD)

Für die eigenen Untersuchungen wird HpD aus Hämatoporphyrin, einem Abbauprodukt von Rinderhämoglobin nach der Methode von LIPSON selbst hergestellt (33): Zwei Gramm des in Pulverform vorliegenden Hämatoporphyrins (= Hp)* werden mit 40 ml eines Eisessig-Schwefelsäuregemisches versetzt (Eisessig zu Schwefelsäure wie 19 : 1). Die Lösung bleibt zwölf Stunden bei Raumtemperatur und Dunkelheit stehen. Durch Zugabe von 3 %iger Natriumacetat-Lösung wird das Reaktionsprodukt auf einen pH-Wert von sechs eingestellt, was zur Ausfällung von HpD führt. Mit einer Ultrazentrifuge läßt sich das präzipitierte Material gewinnen. Anschließend wird das HpD mit destilliertem Wasser dreimal gewaschen, wobei der pH-Wert kontrolliert wird und nach der letzten Waschung einen Wert von sieben aufweisen muß. Im Exsikkator wird das Material nach erneuter Zentrifugation getrocknet (Dauer 24 bis 48 Stunden). Das gewonnene HpD-Pulver wird gewogen. Pro Gramm HpD werden 50 ml mit einer 0,1 normalen Natronlauge zugesetzt. Durch sorgfältiges Rühren wird das HpD in Lösung gebracht. Mit 0,1 normaler Salzsäure wird die Lösung auf einen pH-Wert von 7,25 eingestellt. Der Verbrauch an Salzsäure wird dabei gemessen und pro verbrauchtem Milliliter 0,1 normaler Salzsäure werden 3 mg Kochsalz der Lösung hinzugesetzt. Damit liegt eine injizierbare Hämatoporphyrinderivat-Lösung vor mit einer Konzentration von 5 mg HpD pro Milliliter. Diese wird durch ein entsprechendes Filter steril filtriert.

* HEMATOPORPHYRIN ACETATE POWDER, Cheektowaga, New York
14225

Das so gewonnene HpD wird nach physikalischen und chemischen Gesichtspunkten genau untersucht.

5.1.2 Physikalische und chemische Untersuchung des synthetisierten Hämatoporphyrinderivates

Vor Verwendung des nach vorstehendem Rezept synthetisierten bzw. später käuflich erworbenen HpD wird das Material einer umfangreichen Qualitätskontrolle unterzogen. Die im allgemeinen Teil der Arbeit beschriebenen Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektren werden dazu als erstes bestimmt. Mit einem Spektrophotometer läßt sich die Extinktionskurve des Materials in Abhängigkeit von der Wellenlänge ermitteln. Zu dieser Messung wird HpD mit einer phosphatgepufferten Lösung (PBS*) auf eine Konzentration von 50 µg/ml verdünnt. Dies ist wichtig, um eine pH-abhängige Verschiebung der Wellenlängencharakteristik des HpD zu verhindern, wobei das PBS einen physiologischen pH-Wert gewährleistet. Die Extinktionswerte werden mit dem Beckman Spektrophotometer UV 5230 ermittelt und in Abhängigkeit zur Wellenlänge graphisch aufgetragen.

Die Fluoreszenz von HpD wird mit dem Perkin-Elmer Fluoreszenz-Spektrometer 650-10 S vermessen. Die Probe wird dabei mit 395 nm angeregt, also Licht der Wellenlänge, die aufgrund der Absorptionsverhältnisse des HpD die größte Fluoreszenzausbeute verspricht. Verwendet wird eine Verdünnung von 5 µg HpD pro Milliliter PBS.

Um in etwa einen Anhalt über die unterschiedlichen Komponenten des HpD-Gemisches zu erhalten, werden die HpD-Proben dünnschichtchromatographisch analysiert. Vor der chromatographischen Untersuchung werden die Proben nach dem unter 1.4 beschriebenen Verfahren verestert, um chromatographische

* PBS = 80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄ und 2 g Na - azid ad 10 Liter H₂O

Vergleiche mit den HpD-Proben zu ermöglichen, die bei den entsprechenden Tierversuchen aus dem Gewebe extrahiert werden. Als Chromatographieplatten findet Kieselgel auf Alufolien (Merck Art.-Nr. 5554) mit einer Schichtdicke von 0,25 mm Verwendung. Als Laufmittel dient ein Methanol-Benzol-Gemisch im Verhältnis 4 : 1.

5.1.3 Die verwendeten Tumormodelle

Die Studien zur Pharmakokinetik des HpD laufen an zwei Tiermodellen. Zur Anwendung gelangt der Brown-Pearce-Tumor, ein niederdifferenzierter Hodentumor des Kaninchens, der sich in die Kaninchenblase transplantieren läßt. Eine Zellsuspension mit 10^6 Brown-Pearce-Tumorzellen pro Milliliter in RPMI* mit 10 % FCS* wird dabei über eine endoskopisch geführte Franzén-Feinnadel in die Submukosa der Kaninchenblasenwand eingespritzt (5; 22). Geachtet wird dabei darauf, daß die Implantationsstelle gut vaskularisiert ist, um der leichten Nekrotisierungstendenz des Tumors entgegenzuwirken. Innerhalb von sieben Tagen wächst nach Einspritzen von etwa einem Milliliter Zellsuspension ein durchschnittlich erbsgroßer Tumor heran. HpD wird dem Kaninchen zu unterschiedlichen Zeiten über die Ohrvene in einer Konzentration von 5 mg/kg Körpergewicht injiziert, so daß mit dem siebten Tag nach Tumorimplantation das gewünschte Zeitintervall zwischen systemischer HpD-Verabreichung und der Konzentrationsbestimmung des HpD aus dem Gewebe erreicht ist. Unmittelbar nach Einschläferung des Tieres wird die tumortragende Harnblase entfernt. Anschließend wird der Tumor von gesundem Gewebe nach makroskopischen Gesichtspunkten getrennt und der quantitativen HpD-Bestimmung unterzogen.

Als zweites Modell findet ein nitrosamininduzierter Blasen-tumor bei der Ratte Verwendung. Zur Tumorinduktion wird den

* RPMI 1640, FCS = fetales Kälberserum, GIBCO Europe

Ratten BBN* (20 mg/kg Körpergewicht/Tag/Tier) mit dem Trinkwasser verabreicht. Nahezu alle Tiere entwickeln im Verlauf einer 6 - 10monatigen Tumorinduktionszeit auf diese Behandlung hin einen Blasen-tumor, der sowohl bezüglich seiner Histologie als auch hinsichtlich seines multifokalen Wachstums dem menschlichen Blasen-tumor sehr ähnelt. Die intravenöse Gabe von HpD erfolgt bei den Ratten während einer kurzen Chloralhydrat-Narkose in die operativ freigelegte Vena femoralis. Verwendet wird pro Tier 1 Milliliter der Stammlösung von HpD (5 mg/ml). Zur gewünschten Zeit nach HpD-Gabe wird das Tier eingeschläfert und die Harnblase entnommen.

Neben den tumortragenden Rattenharnblasen werden die Harnblasen unbehandelter gesunder Ratten untersucht. Außerdem werden zu allen Experimenten HpD-freie Kontrollgruppen gebildet.

5.1.4 Die Extraktion von HpD aus dem Gewebe

Die Konzentrationsbestimmung von HpD aus dem Gewebe erfordert ein Verfahren, das der hohen Lichtempfindlichkeit des Materials gerecht wird. Insbesondere ist darauf zu achten, daß Lichteinwirkung mit Wellenlängen, die den Absorptionsmaxima des HpD entsprechen, vermieden wird. Deshalb werden die eigenen Analysen nachts und unter Ausschluß von Neonlicht durchgeführt. Außerdem werden die Proben mit lichtundurchlässiger Aluminiumfolie abgedeckt. Die dem Tier entnommenen Gewebeproben werden möglichst sofort, ohne lange Lagerung verarbeitet.

Vor der Analyse werden die Proben exakt gewogen, um später die extrahierte HpD-Menge dem Feuchtgewicht der Proben zuordnen zu können, also Aussagen über die HpD-Gewebekonzentration zu ermöglichen. Die verarbeiteten Proben wiegen

* BBN = N-n-butyl-N-buten-4-ol-Nitrosamin, TCI Tokyo Kasei

zwischen 0,1 und 0,4 Gramm. Von größeren Proben werden entsprechende Stücke dieses Gewichtsbereiches entnommen. Das Gewebe wird anschließend in 10 ml Kochsalzlösung mit dem Ultra-Turrax* so zerhackt, daß eine trübe Gewebssuspension ohne größere Gewebepartikel entsteht. Diese Lösung wird mit 50 ml Methanol-Schwefelsäure (im Verhältnis 19 : 1) 24 Stunden bei Raumtemperatur verestert. Dieser Prozeß verändert das HpD so, daß es nunmehr mit Chloroform aus der Lösung herausgezogen werden kann. In einen Scheidetrichter werden zu der Gewebssuspension 80 ml Chloroform gegeben. Nach einer entsprechenden Ausgleichszeit, in der sich die Konzentrationen an verestertem HpD entsprechend dem Nernst'schen Verteilungsgleichgewicht einstellen können, wird die Chloroformphase nach unten abgelassen. Dieser Auswaschvorgang wird mit je 50 ml Chloroform dreimal wiederholt. Dem letzten Extraktionsvorgang werden dabei zur Neutralisation 40 ml einer 0,1 normalen Natriumbikarbonatlösung hinzugefügt. Das HpD liegt nach diesem Verfahren so gut wie vollständig in Chloroform gelöst vor. Diese Chloroformphase wird nachfolgend filtriert und in einem Rotationsverdampfer bei 38 °C zur Trockene eingedampft. Zur Entfernung eventuell noch vorhandener Spuren an Wasser wird dem Kolben ein Teelöffel Natriumsulfat hinzugefügt, anschließend der Kolben mit exakt 100 ml Chloroform wieder aufgefüllt. Innerhalb einer Standzeit von etwa einer Stunde hat sich das Natriumsulfatpulver am Boden des Kolbens abgesetzt, so daß das in klarem Chloroform gelöste HpD nun zur Messung abgehoben werden kann.

5.1.5 Die Bestimmung der HpD-Konzentration

Die Proben werden zunächst im Beckman-Spektrometer analysiert. Das Absorptionsspektrum wird in einem Wellenlängenbereich von 300 bis 800 nm vermessen und der Kurvenverlauf

* Junke Kunkel KG 7813 Staufen: Ultra-Turrax Typ TP/18/10

mit dem bekannter Proben verglichen. Anschließend wird die Extinktion bei 400 nm numerisch gemessen. Der Kolbeninhalt wird entsprechend dem Meßergebnis solange verdünnt, bis er bei 400 nm eine Extinktion zwischen 0,01 und 0,015 aufweist. Da jede Messung die Probe mehr oder weniger stark ausbleicht, wird für jede Einzelmessung eine frische Probe aus dem Kolben entnommen. Die anhand der Extinktion erstellte Verdünnung gewährleistet in etwa, daß im folgenden innerhalb eines Konzentrationsbereiches vermessen wird, in dem die Fluoreszenzausbeute proportional der HpD-Konzentration ist. Mit dem Perkin-Elmer-Fluoreszenz-Spektrometer wird nun die Fluoreszenz der Proben quantitativ ermittelt, wobei die Proben mit 412 nm angeregt bei einer Emissionswellenlänge von 601 nm erfaßt werden. Zur Sicherstellung, daß die Fluoreszenzmessung auch wirklich im Proportionalitätsbereich vorgenommen wird, werden aus den Proben noch weitere Verdünnungen erstellt, die analog fluorometrisch vermessen und hinsichtlich ihrer Proportionalität verglichen werden. Außerdem wird auf einem Schreiber die Emissionscharakteristik über den Wellenlängenbereich 400 bis 700 nm aufgezeichnet, woraus ersichtlich wird, ob ausschließlich HpD aus den Proben analysiert wird oder noch Fremdmoleküle die Messung überlagern.

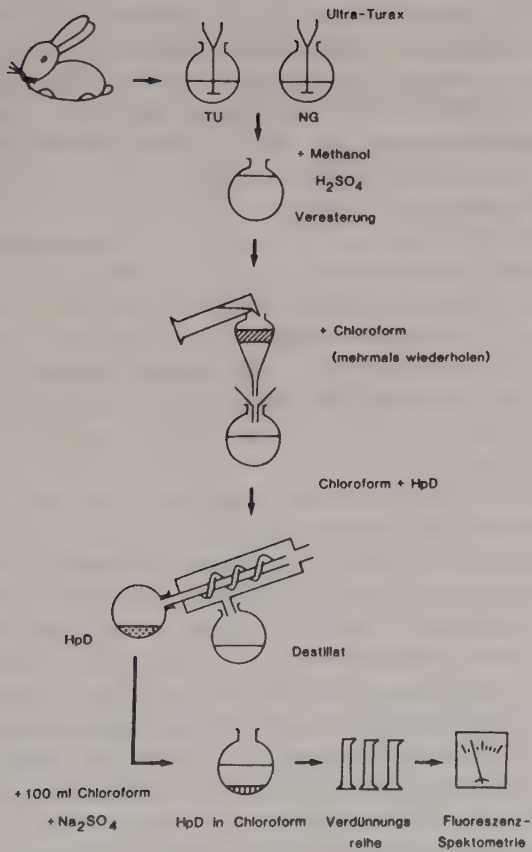


Abb. 4: Schematische Darstellung der Extraktionsschritte von Hämatoporphyrinderivat aus dem Gewebe

5.1.6 Die Auswertung der Meßergebnisse

Zur Erstellung einer Eichkurve werden Ansätze mit bekannten HpD-Konzentrationen verestert und den geschilderten Extraktionsschritten unterzogen. Verwendet werden dabei HpD-Mengen kleiner 10 µg, um zu gewährleisten, daß auch die gesamte HpD-Menge im Rahmen der Reaktion verestert wird. Die fluorometrisch ermittelten Werte der Gewebeproben können anhand der nunmehr erstellten Eichkurve entsprechenden HpD-Mengen zugeordnet werden. Unter Berücksichtigung aller Verdünnungen und des Eigengewichtes der analysierten Gewebeproben lassen sich die HpD-Konzentrationen nunmehr direkt in Mikrogramm HpD pro Gramm Gewebe angeben.

Aus der Messung geht hervor, daß die Fluoreszenzausbeute nur bis zu einer HpD-Konzentration von 2,5 µg/ml proportional zu der HpD-Konzentration korreliert. Oberhalb dieser Konzentration findet sich sehr schnell eine Sättigung. Die Fluoreszenzausbeute sinkt mit weiter steigender Konzentration rapid ab, wobei das Material ab einer Konzentration von 0,5 mg/ml so dicht wird, daß eine Fluoreszenz so gut wie nicht mehr nachweisbar ist.

Die analoge Fluoreszenzkurve des HpD, das die chemischen Extraktionsschritte durchlaufen hat, zeigt, daß die Fluoreszenzausbeute gegenüber nichtverestertem HpD um den Faktor 5,8 zurückgegangen ist. 10 µg/ml liegen dabei noch gut im Proportionalbereich. Trotzdem werden für die meisten Gewebanalysen noch Verdünnungsreihen angefertigt. Dabei erweist sich, daß der Proportionalitätsbereich der Fluoreszenzausbeute bei den Gewebeproben häufig in niedrigere Konzentrationsbereiche verschoben ist. Der Grund für diese Verschiebung ist die Überlagerung der Fluoreszenzkurve durch fluoreszierende Verunreinigungen der Gewebeproben. Damit eine Verzerrung der Meßergebnisse durch diese Überlagerung vermieden wird, müssen die Kurven, wie in folgender Abbildung demonstriert, ausgewertet werden.

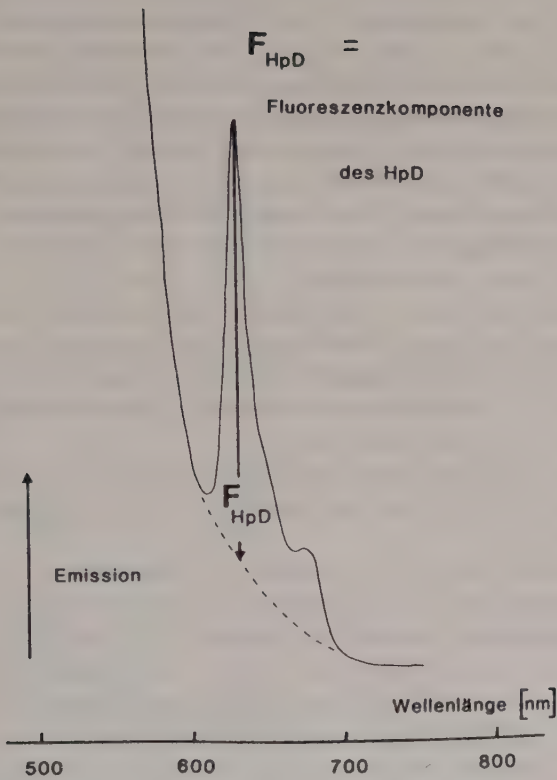


Abb. 5: Durch Extrapolation wird zwischen 600 und 700 nm der für HpD-freies Gewebe typische Kurvenverlauf ermittelt. F_{HpD} entspricht der dem HpD zugehörigen Fluoreszenzausbeute.

5.2 Die Zellkulturversuche

5.2.1 Die verwendeten Zellkulturen und die damit verbundene Fragestellung

Für die in vitro Bestrahlungsexperimente finden dreierlei Zellkulturen Verwendung. Für die Basisuntersuchungen wird der Brown-Pearce-Tumor benutzt. Es handelt sich dabei um ein niederdifferenziertes Hodenkarzinom des Kaninchens. Mehrere Gründe lassen die Untersuchung dieser Zelllinie sinnvoll erscheinen. Zum einen handelt es sich bei dem Brown-Pearce-Tumor um eine außerordentlich robuste Zelllinie mit kurzer Zellverdopplungszeit. Die schnelle Zellvermehrung ermöglicht, eine hohe Zahl an Experimenten in der zur Verfügung stehenden Zeit durchzuführen.

Die Unempfindlichkeit des Tumors rechtfertigt die Überlegung, daß die Bestrahlungsdosis und HpD-Konzentration als obere Grenze dessen angesehen werden kann, was überhaupt erforderlich ist zur Devitalisierung von Zellkulturen mit Hilfe der Photoradiotherapie.

Außerdem wird ein Teil der Tierversuche (24) mit diesem Tumor durchgeführt, so daß gegebenenfalls Parallelen gezogen werden könnten.

Zwei weitere Zelllinien ergänzen die Ergebnisse, die mit den Brown-Pearce-Zellen ermittelt sind. Verwendet werden Zellen, die menschlichem Gewebe entstammen. Es handelt sich dabei einerseits um die Zelllinie AS 187, die einem menschlichen Blasentumor entstammt, sowie die Zelllinie BD 156, die aus gesundem Blasenurothel gezüchtet ist. Die Zellen erweisen sich in ihrer Zellkulturhaltung als wesentlich sensibler als die Brown-Pearce-Zellen, so daß mit den menschlichen Zellen aufgrund ihres langsamen Wachstums nicht die große Vielzahl von Experimenten gemacht werden kann wie mit den Kaninchenzellen. Dennoch sollten die humanen Zelllinien zu einigen wichtigen Fragen Auskunft geben.

Erstens interessiert, ob diese Zellkulturen ähnlich wie die Brown-Pearce-Zellen auf eine Photoradiotherapie reagieren, insbesondere ob ihre höhere Empfindlichkeit in der Zellkulturhaltung auch ein deutlicheres Ansprechen auf die Photoradiotherapie hat.

Wichtigste Fragestellung in Verbindung mit den humanen Zellkulturen ist jedoch, ob sich bei diesen in-vitro-Experimenten Unterschiede zwischen den entarteten und gesunden Zellen in ihrer Reaktion auf die Photoradiotherapie aufzeigen lassen. Ein Aussage zu dieser letzten Frage könnte zeigen, ob das unterschiedliche Verhalten von Tumor gegenüber gesundem Gewebe hinsichtlich der Photosensibilisierung mit HpD in intra- oder extrazellulären Differenzierungsmechanismen zu suchen ist.

5.2.2 Die Zellkulturhaltung und Vorbereitung der Zellen zu den Bestrahlungsversuchen

Die Zellen werden in handelsüblichen Kulturflaschen in geeigneten Brutschränken gezüchtet. Die Brown-Pearce-Zellen wachsen in RPMI*, das mit 10 % fötalem Kälberserum angereichert ist. Der pH-Wert des Mediums wird kontrolliert und normalerweise durch Hinzufügen von 2,5 ml einer 8,4 %igen Natriumbikarbonatlösung auf den Wert von 7,6 eingestellt. Bei einer Bebrütungstemperatur von 37,5 °C können die Zellkulturen unter einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre bis zur gewünschten Zelldichte heranwachsen. Die Zelllinie BD 156, die gesundem menschlichen Blasengewebe entstammt, wird in DEM* angezüchtet. Zum Medium wird Rinderinsulin gegeben sowie nichtessentielle Aminosäuren. Die Bebrütungsbedingungen sind wie beschrieben. Die Zelllinie AS 187, die aus humanem Blasenkarzinom etabliert wurde, erfordert zu ihrer Züchtung

* GIBCO Europe

MEM* mit 10 % fötalem Kälberserum bei ansonsten gleichen Bebrütungsbedingungen. Das teilweise recht langsame Wachsen der Zellen kann beschleunigt werden, wenn die Konzentration an fötalem Kälberserum verändert wird. Die optimierten Konzentrationen liegen zwischen 5 und 20 %. Der pH-Wert des Kulturmediums wird unter Raumluft bei jeder Zellfütterung auf genau 7,6 eingestellt. Die folgende Bebrütung der Zellkulturen unter 5 % CO₂ führt zu einem pH-Abfall auf etwa 7,2. Da der pH-Wert sich auch temperaturabhängig ändert, werden die Medien generell bei der Bebrütungstemperatur von 37 °C vermessen.

Alle Manipulationen an den Zellkulturen werden unter streng sterilen Kautelen vollzogen. Dies erfordert unter anderem die Verwendung von Laminar-Flow-Geräten, die eine absolut keimfreie Luft bei der Arbeit an den Zellen gewährleisten. Die Zellen haften bei ihrer Anzucht in den Kulturflaschen am Plastikboden der Behältnisse fest an. Zur Entnahme der Zellen aus den Flaschen wird zunächst durch Spülung mit Ca⁺⁺- und Mg⁺⁺-freier Hankscher Lösung das Calcium des Nährmediums ausgewaschen. Mit Trypsin, das durch vorhandenes Calcium inhibiert würde, kann die Zellkultur vom Flaschenboden abgelöst werden. Wichtig ist, daß die Einwirkungszeit des Trypsin kurz gehalten wird, was erreicht werden kann durch Arbeiten im Temperaturoptimum des Enzyms (37 °C) und vor allem durch mechanische Unterstützung. Mit Pasteurpipetten, die über einer heißen Flamme gebogen wurden, können die Zellen aus den Flaschen gespült werden. Unter Verwendung einer Zentrifuge werden die Zellen mehrmals mit Hankscher Lösung gewaschen. Anschließend wird die Zelldichte in einer Zählkammer nach NEUBAUER unter dem Mikroskop ausgezählt. Die für die Experimente erforderliche Zelldichte kann durch Hinzufügen oder Abzentrifugieren des Nährmediums eingestellt werden. Die Zellvitalität wird durch Färbung mit Trypan-Blau ermittelt.

* GIBCO Europe

5.2.3 Die zur Zellbestrahlung verwendete Lichtquelle

Wie im allgemeinen Teil angedeutet, ist die Eindringtiefe von Licht wellenlängenabhängig. Entsprechend den Ergebnissen von PETERSON (47) gewährleistet nur Licht mit einer Wellenlänge von mindestens 600 nm eine für die Phototherapie des Blasenkarzinoms ausreichende Eindringtiefe. Für die eigenen Experimente scheint es deshalb ratsam, den Absorptionspeak des HpD bei 630 nm mit einer nahezu monochromatischen Lichtquelle zu nutzen. Bei den eigenen Experimenten wird ein Farbstofflaser (Spectra Physics Modell 375) von einem Argon-Ionen-Laser (Spectra Physics Modell 171) gepumpt. Als Farbstoff dient Rhodamin B-Perchlorat. Mit dieser Anordnung erhält man einen Laserstrahl, der mit seiner Wellenlängencharakteristik bei 615 - 635 nm genau im Absorptionspeak des verwendeten HpD liegt. Die Ausgangsleistung des Farbstoff-Lasers beträgt maximal zwei Watt. Der Farbstoff-Laserstrahl wird mit einer 100 mm Sammellinse auf das plangeschnittene Ende eines 400 µm starken Lichtleiters fokussiert. Am distalen Ende des Lichtleiters verläßt das Rotlicht als Lichtkegel den Lichtleiter mit einem Divergenzwinkel von etwa 20°. In Form eines beliebig großen Kreises läßt sich das Licht durch Variation des Abstandes Lichtleiter - zu bestrahlender Fläche mit dem senkrecht über die zu bestrahlende Probe gehaltenen Lichtleiter projizieren. Die homogene Lichtleistungsverteilung innerhalb des Projektionskreises läßt sich mit spezieller Technik innerhalb $\pm 10\%$ sicherstellen, was mit Hilfe eines Lichtleistungsmeßgerätes* kontrolliert wird.

* Powermeter Coherent Radiation - Palo Alto Model No 201

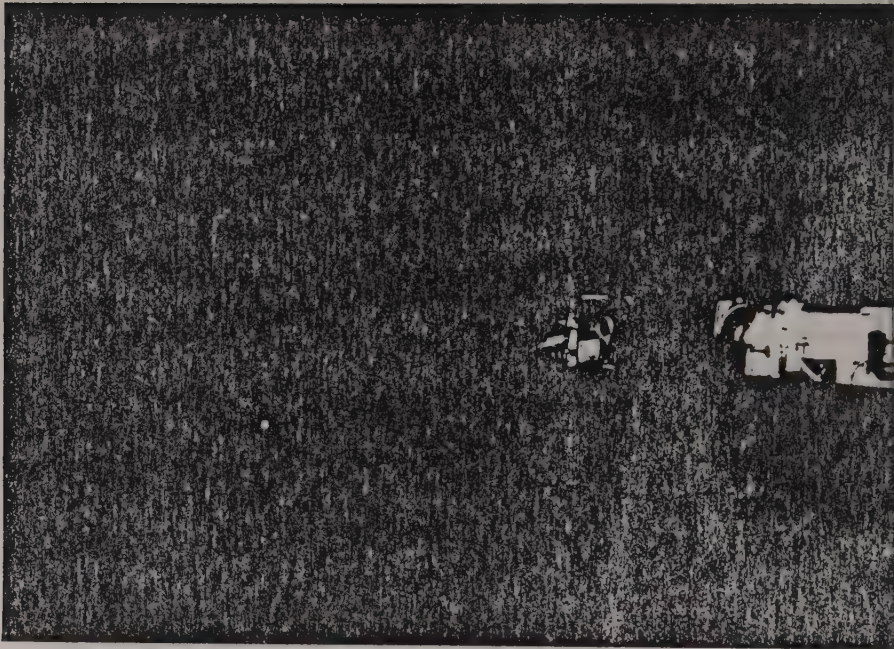


Abb. 6: Der für die Bestrahlung von Zellkulturen verwendete Versuchsaufbau bestehend aus Argon-Laser, Farbstoff-Laser, Lichtleisten und Lab-Tek-Platte

5.2.4 Die Laserbestrahlung der Zellen

Nach Kultivieren und Gewinnung der Zellen nach beschriebener Methode wird die Vitalität der Zellen mit dem Trypan-Blau-Test bestimmt. Die vitale Zelle besitzt die Eigenschaft, diesen Farbstoff aus dem Zellinneren fernzuhalten; die avitale Zelle dagegen färbt sich mit Trypan-Blau an. Ein Tropfen Zellsuspension wird der zu untersuchenden Zellkultur entnommen und auf einem Objektträger mit einem Tropfen Trypan-Blau-Kochsalzlösung vermenget. Die Trypan-Blau-Lösung ist so verdünnt, daß eine gute Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen möglich ist. Üblicherweise werden 100 Zellen auf dem Objektträger ausgezählt, um dann die ungefärbten, also vitalen Zellen zur Gesamtzellzahl in Relation zu setzen. Mit Ausnahme der Humankarzinomzellen werden nur Zellkulturen zu den Experimenten herangezogen, deren Zellvitalität mindestens 90 % beträgt. Dies läßt sich im allgemeinen gut erreichen, wenn vor dem Ablösen der Zellen aus den Kulturflaschen mit Trypsin die Zellkultur mehrmals mit Hank Lösung gewaschen wird, so daß die avitalen Zellen, die frei in der Lösung schwimmen, herausgespült werden. Die Einwirkungszeit von Trypsin auf die Zellkultur wird auf wenige Minuten beschränkt. Nach der Vitalitätskontrolle der gewonnenen Zellsuspension wird durch Verdünnen oder Abzentrifugieren die Zelldichte der Suspension auf ca. 10^5 Zellen pro Milliliter Nährmedium eingestellt. Diese Lösung wird nun zu je 0,3 ml auf die acht Felder einer Lab-Tek-Platte* verteilt. Zwei Felder der Lab-Tek-Platte bleiben als Kontrollfelder HpD-frei. Die restlichen sechs Felder werden mit einer geometrischen Verdünnungsreihe von HpD mit Nährmedium mit den interessierenden HpD-Konzentrationen versehen. Die Lab-Tek-Platten werden zu den üblichen Kulturbedingungen 48 Stunden bebrütet. Vor der Laser-Bestrahlung werden 0,2 ml Medium je Feld von der Lab-Tek-Platte

* Lab-Tek Division, Mile Laboratories, Inc.
30 W 475 North Aurora Road, Naperville, IL 60540

entfernt. Anschließend werden die Platten bestrahlt. Dazu ist das plangeschnittene Lichtleiterende des von dem Farbstoff-Laser gespeisten Lichtleiters im Abstand von 22,5 cm senkrecht über der Lab-Tek-Platte befestigt. Durch diesen Abstand wird ein Bestrahlungsfeld erzielt, das innerhalb eines Kreises von 4,5 cm nahezu homogen ausgeleuchtet wird. Zur Verhinderung einer zu starken Lichtabsorption und damit Erwärmung durch die Unterlage wird unter die Lab-Tek-Platte weißer Stoff gelegt. Die Bestrahlung erfolgt bei geöffneten Lab-Tek-Platten zu den jeweils gewünschten Lichtleistungs-/Bestrahlungszeitbedingungen. Nach weiteren 24 Stunden Bebrütungszeit werden das Mittel- und Oberteil der Lab-Tek-Platten abgenommen und die Einzelfelder der Platte mit je einem Tropfen Trypan-Blau gefärbt. Unter einem Mikroskop können die Platten mit dem 10fach-Objektiv ausgewertet werden. Pro Feld werden hundert Zellen ausgezählt; bei einer Zellvitalität unter einem Prozent wird die Genauigkeit der Vitalitätstestung durch Auszählen von bis zu 1000 Zellen pro Feld in den Promillebereich hinein verfeinert.

5.2.5 Laserbestrahlung photosensibilisierter Zellen unter Verwendung von ^3H -Thyminidin zur Vitalitätstestung

Als Ergänzung zur Trypan-Blau-Methode als Vitalitätsnachweismethode werden Experimente mit dem Beta-Strahler ^3H -Thyminidin durchgeführt. Die aus den Kulturflaschen gewonnene Zellsuspension wird auf eine Zelldichte von 10^6 Zellen/ml Nährmedium eingestellt. Je 0,2 ml dieser Nährlösung werden auf 90 Felder einer Mikrotiterplatte gegeben. Die restlichen sechs Felder der Platte erhalten zellfreies Nährmedium. Sechs der 90 Felder bleiben HpD-frei, die restlichen 84 Felder werden mit einer geometrischen Verdünnungsreihe von HpD versehen, wobei je sechs Felder eine bestimmte HpD-Konzentration erhalten.

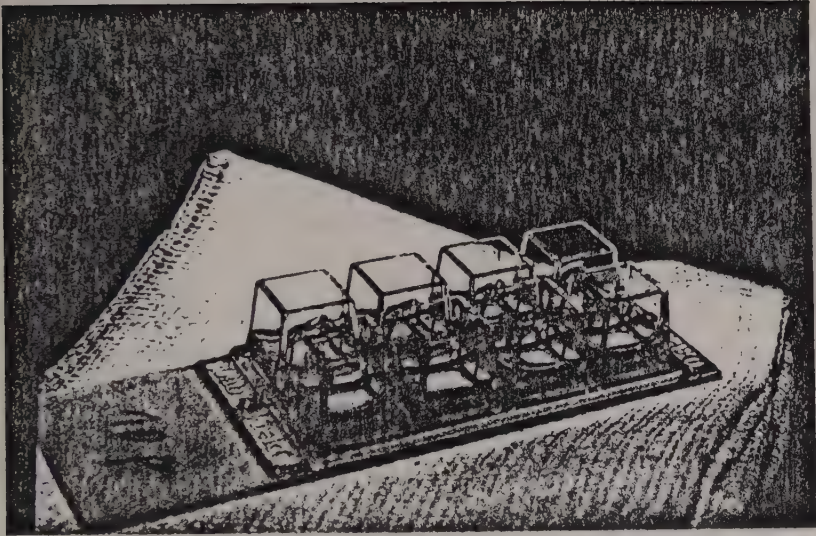


Abb. 7: Lab-Tek-Platte mit Zellkulturen im Bestrahlungsfeld des Farbstofflasers

Nach einer Bebrütungszeit von 48 Stunden erfolgt die Laserbestrahlung zu den jeweils interessierenden Lichtleistungs-/Zeitbedingungen. Der Abstand zwischen dem senkrecht über der Kulturplatte befestigten Lichtleiterende und der zu bestrahlenden Platte beträgt 75 cm, was einer homogenen Ausleuchtung von einem Kreis mit ca. 14 cm Durchmesser entspricht. Direkt im Anschluß an die Bestrahlung werden alle 96 Felder der Mikrotiterplatte mit je 0,02 ml einer ^3H -Thymidin-Lösung versehen und weitere 24 Stunden bebrütet. Zur Vitalitätsbestimmung werden die Kulturplatten nun etwa 12 Stunden lang bei -12°C eingefroren, was eine Zellzerstörung zur Folge

hat. Nach Wiedererwärmung der Kulturplatten auf 37 °C wird das Medium der 96 Felder durch eine Trypsinlösung ersetzt. Unter mikroskopischer Kontrolle wird das Ablösen der Zellfragmente vom Plattenboden abgewartet. Mit einer Vakuumpumpe wird die Suspension jedes einzelnen Feldes so durch ein Filterpapier gesaugt, daß die Zellfragmente auf dem Papier zurückbleiben. Die pro Kulturplatte entstehenden 96 Filterplättchen werden nun getrocknet und in einem Plastikreagenzröhrchen mit je 4 ml Rotiscint, einem toluolhaltigen Szintillationsmedium versetzt. In einem Szintillationszähler werden die Einzelproben vermessen und die Daten auf einen Rechner übertragen. Die Auswertung erfolgt über die Mittelung der je sechs zusammengehörigen Proben. Die Szintillationsrate der zellfreien Felder wird als Basisaktivität gewertet und von den restlichen Proben subtrahiert. Die Aktivität der HpD-freien Proben abzüglich der Basisaktivität wird als Ausgangsvitalität betrachtet und analog den Ausgangsvitalitäten, die mit dem Trypan-Blau-Test ermittelt sind, gleich 90 % gesetzt. Die Zwischenwerte der Szintillationsmessung werden proportional dazu in Prozentwerte umgerechnet.

5.2.6 Untersuchungen zur fraktionierten Bestrahlung von Zellkulturen

Aus der Strahlentherapie ist die Anwendung einer fraktionierten Bestrahlung bekannt, die zu einer Verringerung therapeutisch notwendiger Bestrahlungsdosen führen kann. Es erscheint daher sinnvoll, Experimente zur Fraktionierung der Lichtbestrahlung photosensibilisierter Zellen vorzunehmen. Zur Bestimmung günstiger Bestrahlungsintervalle wird zunächst die Länge des Zellzyklus der verwendeten Brown-Pearce-Zellkulturen unter den normalen Bebrütungsbedingungen untersucht. Als indirektes Maß hierfür wird die Zellverdopplungszeit ermittelt: Zwanzig kleine Petrischalen mit einer

Zelldichte von etwa 10^3 Zellen werden unter Standardbedingungen bebrütet. Täglich werden vier Petrischalen gespült und mit Trypsin behandelt. Sobald alle Zellen aus der Petrischale abgelöst sind, werden die Zellen in einer Zählkammer ausgezählt.

Die Wachstumszahlen folgen einer exponentiellen Kurve. Die Wachstumskurve wird beschrieben durch die Formel:

$$N_n = N_o \cdot 2^{\frac{24n}{t}},$$

mit N_o gleich die Ausgangszellzahl, N_n gleich die zum Tag n gezählte Zellzahl und t die Verdopplungszeit.

Zur Fraktionierung der Bestrahlung werden Versuchsserien mit 12 bzw. 24 Stunden Intervallen durchgeführt. In den ersten beiden Serien werden Einzelbestrahlungsdosen verwendet, die ca. 50 % der Zellen im Rahmen der Erstbestrahlung abtöten. In einer dritten Serie soll gezeigt werden, daß bereits eine HpD-Konzentration von $0,1 \mu\text{g}$ pro Milliliter Nährmedium die Zellen gegenüber Licht so photosensibilisiert, daß die Zellpopulation durch Anwendung einer fraktionierten Bestrahlung völlig devitalisiert werden kann.

5.2.7 Experimente zur HpD-Ausschleusung aus der Zelle, Vergleich zwischen gesunden und entarteten Zellen

Die Mechanismen der HpD-Anreicherung im Tumor gegenüber gesundem Gewebe sind noch weitestgehend unbekannt. In den folgenden Experimenten wird versucht, die Pharmakokinetik des HpD auf zellulärer Ebene weiter aufzuklären.

Aus den in-vitro Bestrahlungsexperimenten wird ersichtlich, daß extrazelluläres HpD etwa in gleichem Maß die entarteten wie die nichtentarteten Zellen photosensibilisiert. Über die intrazelluläre HpD-Konzentration läßt sich dabei keine Aussage treffen.

Im folgenden wird versucht, mit einem Experiment die HpD-Ausschleusung aus der Einzelzelle quantitativ in Abhängigkeit zur Zeit zu ermitteln. Die zu untersuchenden Zellen werden in den Kulturflaschen, die üblicherweise zur Anzucht der Zellen Verwendung finden, mit 50 µg HpD pro Milliliter Nährmedium versetzt. Diese HpD-Konzentration gewährleistet unter Lichtausschluß noch ein ausreichendes Zellwachstum. Die Zelldichte in den Kulturflaschen wird ermittelt. Nach einer HpD-Einwirkungszeit von 48 Stunden werden die Kulturflaschen mit Hank'scher Lösung so lange gespült, bis sich fluorometrisch kein HpD mehr in der Spülflüssigkeit nachweisen läßt. Die Zellen werden nun mit wenigen Millilitern farbloser Hank'scher Lösung überschichtet und einen Tag lang bei 37 °C bebrütet. An dem darauffolgenden Tag wird diese Hank'sche Lösung auf ihren HpD-Gehalt hin untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist, daß im Rahmen der fluorometrischen Nachweisempfindlichkeit zu keiner Zeit nach Entfernung extrazellulären HpD's im extrazellulären Nährmedium HpD gefunden werden kann, das die Zellen wieder ausgeschleust haben. Dieses Experiment erweist sich meßtechnisch damit als unempfindlich zur Beantwortung der Frage. Im folgenden wird versucht, mit einer indirekten Methode über die noch offene Frage Auskunft zu bekommen.

Als indirektes Maß für die intrazelluläre HpD-Konzentration wird die Lichtempfindlichkeit der Zellen gewertet. Brown-Pearce-Zellen sowie gesunde menschliche Blasen­zellen werden, wie unter 1.2.2 beschrieben, auf Lab-Tek-Platten angesetzt. Nach einer HpD-Einwirkungszeit von 24 Stunden wird ein Drittel der vorbereiteten Platten mit Hank'scher Lösung mehrmals gewaschen und anschließend mit Nährmedium ohne HpD wieder versehen. Nach weiteren 24 Stunden wird das gleiche Vorgehen bei einem weiteren Drittel der angesetzten Lab-Tek-Platten angewandt. Nach nochmals weiteren 24 Stunden werden alle Lab-Tek-Platten einer Laserbestrahlung unterzogen und anschließend die Zellvitalität bestimmt.

Mit diesem Experiment soll geklärt werden, ob der Photosensibilisierungsgrad der Tumorzellen ein anderes Verhalten nach HpD-Auswaschung zeigt, als der gesunder Harnblasenzellen.

5.2.8 Intrazelluläre HpD-Bestimmung mit Hilfe zeitaufgelöster und mikroskopischer Fluoreszenzmessung

Zur Untersuchung der zellspezifischen Pharmakokinetik des HpD wird in Zusammenarbeit mit der GSF Neuherberg mit einer Apparatur gearbeitet, die auf mikroskopischer Ebene die Fluoreszenzausbeute zeitaufgelöst messen kann (51). Ein modifizierter Argonlaser (2; 51) erzeugt Lichtimpulse, die bei einer Wellenlänge von 364 nm und einer Frequenz von 82 MHz eine Impulsdauer von 100 Picosekunden aufweisen. Mit einem elektrooptischen Verschluss wird die Impulszahl auf 250 000/sec vermindert, bevor die Impulse durch das Beleuchtungssystem eines Mikroskops auf die zu vermessenden Proben gelenkt werden. Die Zellfluoreszenz wird über das Mikroskop-Objektiv auf die Elektrode eines Photomultipliers fokussiert, verstärkt und zeitaufgelöst in Abhängigkeit vom Anregungsimpuls vermessen.

Die untersuchten Zellen sind wiederum die bereits beschriebenen drei Zellkulturen BD 156 (humanes gesundes Blasenurothel), AS 187 (humanes Blasenkarzinom) und Brown-Pearce-Tumorzellen. Die Zellen werden in den entsprechenden Medien mit 5 µg HpD pro ml Nährlösung angezüchtet. Daneben werden HpD-freie Kontrollen gehalten. Die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung erfolgt in geöffneten Petrischalen an den festgewachsenen lebenden Zellen, nachdem das indikatorhaltige Nährmedium durch farblose Hank'sche Lösung vollständig ersetzt worden ist (mehrmaliges Waschen der Zellkulturen mit farbloser Hank'scher Lösung). Vergleichende Untersuchungen an Tumor- bzw. gesunden Zellen werden durchgeführt zur Ermittlung des Fluoreszenzverhaltens der Einzelzelle.

Außerdem wird durch Anwendung einer hohen kontinuierlichen Laserbestrahlung eine zeitabhängige Verringerung der Fluoreszenzausbeute beobachtet. Dieses "Ausbleichen" der Zellen wird in Beziehung zur eingesetzten Bestrahlungsdauer vermessen.

5.3 Experimente zur Lichtstreuung

5.3.1 Experimente am Glasmodell einer Harnblase mit Intralipid^R als Streumedium

Die interessierenden physikalischen Eigenschaften zur Lichtstreuung durch Intralipid^R werden mit einem Modell erfaßt, das die technischen Gegebenheiten einer integralen Laserbestrahlung der menschlichen Harnblase simulieren kann. Das distale Ende eines unter hoher Temperatur zu einer Spitze ausgezogenen Lichtleiters von 600 µm Stärke wird durch einen dicht schließenden Gummistopfen in den Mittelpunkt einer Glaskugel zentriert. Das Fassungsvermögen der Glaskugel beträgt 320 ml. Wiederum dient als Lichtquelle der bereits beschriebene Farbstofflaser.

Mit einem Gleichstrommotor, der von einem stufenlos regelbaren Netzteil gespeist wird, kann eine Photodiode* waagrecht um die Glaskugel mit beliebig wählbarer Geschwindigkeit geführt werden. Die Photodiode selbst ist in einem geerdeten Aluminiumgehäuse untergebracht. Dieses Gehäuse nimmt weiterhin eine kleine 9 Volt-Batterie und die zur Proportionschaltung der Photodiode erforderlichen Widerstände auf. Über ein Koaxialkabel ist diese Anordnung mit einem Analogschreiber verbunden. Die Verschaltung der Photodiode soll einen Linearbetrieb der Diode innerhalb der Lichtleistung gewährleisten, die während der Messung auftritt.

Die folgenden Abbildungen zeigen die verwendete Apparatur:

* Hewlett Packard 5043-4207

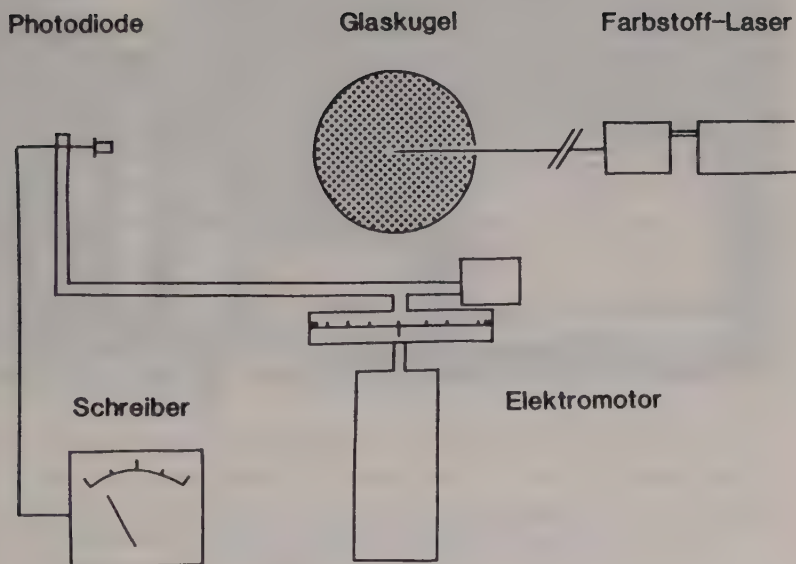


Abb. 8: Schematische Darstellung der Apparatur, die Verwendung findet zur Erfassung der Lichtstreuung durch Intralipid^R

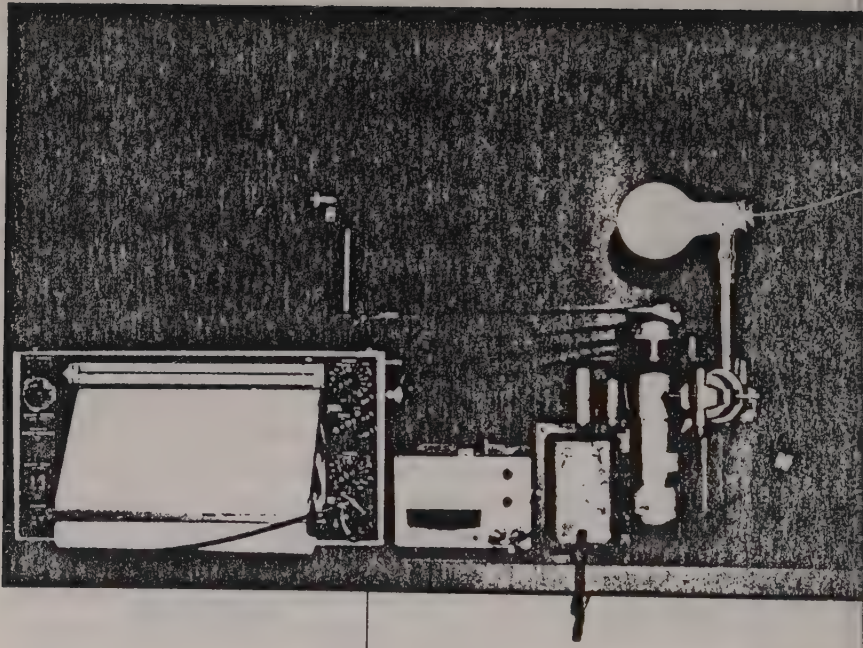


Abb. 9: Versuchsaufbau zur Streulichtmessung an einer mit Intralipid^R gefüllten Glaskugel

In einem Vorversuch wird getestet, ob die zu vermessende Lichtleistungsbreite vollständig im linearen Arbeitsbereich der Photodiode liegt. Dazu wird in den Lichtkegel des Laserstrahls, der aus dem distalen Lichtleiterende austritt, sowohl die Photodiode als auch das Thermoelement eines Powermeters* gehalten. Während der schrittweisen Erhöhung

* Powermeter Model No 201 Coherent Radiation - Palo Alto

der Laserausgangsleistung wird kontrolliert, ob der Zeigerausschlag des Powermeters synchron mit der Aufzeichnung des Analogschreibers verläuft. Alle weiteren Messungen erfolgen ausschließlich innerhalb dieses ermittelten Bereiches. Die erste Messung soll die für die Zellkulturversuche verwendete plangeschnittene Lichtleiterspitze in ihrer Ausgangscharakteristik erfassen. Die Photodiode wird dazu im Abstand von 30 cm um die Lichtleiterspitze geführt. Das Meßergebnis wird in Abhängigkeit zu den Polarkoordinaten registriert.

Im folgenden Experiment wird an der Apparatur unter Verwendung der Glaskugel mit 320 ml Fassungsvermögen die Streuung verschiedener Verdünnungen von Intralipid^R mit Wasser untersucht. Die Lichtleistung wird dabei wiederum in Abhängigkeit von den Polarkoordinaten registriert, wobei 180° der Lichtleistung in Verlängerung des Lichtleiters entspricht und 0° die exakt nach rückwärts abgegebene Lichtleistung anzeigt.

5.3.2 Experimente mit abgewinkeltem Lichtleiter

Der im Experiment verwendete Glaskolben hat den Nachteil, daß über die retrograde Streuung keine exakte Aussage getroffen werden kann, da sich im Winkelbereich von $\pm 30^\circ$ um die retrograde Achse der Einfüllstutzen des Kolbens in der Projektionslinie zwischen Lichtleiterspitze und Photodiode befindet.

Ein Lichtleiter wird nach Abschälen der äußeren Kunststoffmantels unter hoher Temperatur im 90° -Winkel abgebogen. Der abgewinkelte Schenkel wird auf eine Länge von 3 mm gekürzt und anschließend noch einmal hoher Temperatur ausgesetzt. Es entsteht dadurch ein gewinkelter Lichtleiter, dessen Lichtaustrittsstelle kugelig verschmolzen ist. Um einen prograden Lichtaustritt an der Abwinkelungsstelle zu verhindern, wird diese Stelle mit schwarzer Farbe abgedeckt. Der Lichtleiter

wird in der bereits beschriebenen Anordnung in seiner Ausgangscharakteristik vermessen. Anschließend werden wiederum unter Verwendung der Glaskugel verschiedene Verdünnungen von Intralipid^R in ihrem Streuverhalten untersucht.

5.3.3 Messungen zur Kohärenz der Lichtstreuung an Intralipid^R

Eine wichtige Voraussetzung, die das Streumedium bei seiner Anwendung im Rahmen der Tumorthherapie erfüllen muß, ist, daß die Lichtstreuung nicht mit einer Veränderung der Wellenlänge des gestreuten Lichtes einhergeht.

Mit Hilfe des Perkin-Elmer-Fluoreszenz-Spektrometers kann diese Voraussetzung untersucht werden.

Auf die zu vermessende Substanz wird ein monochromatischer Lichtstrahl gerichtet, dessen Wellenlänge im Bereich zwischen 280 und 800 nm eingestellt werden kann. Im rechten Winkel zu dem Exzitationslichtstrahl wird die Lichtintensität mit einer Photodiode gemessen, die die Substanzprobe wieder abstrahlt. Die Empfindlichkeit der Photodiode ist auf eine Wellenlänge eingeschränkt, wobei auch diese Wellenlänge im Bereich von 280 bis 800 nm frei wählbar ist. Dieses Grundprinzip eines Fluoreszenz-Spektrometers läßt sich zur Vermessung der Kohärenz der Lichtstreuung an Intralipid^R heranziehen.

In einer Küvette wird Intralipid^R mit dem Perkin-Elmer-Fluoreszenz-Spektrometer vermessen. Dabei wird die Emulsion mit 625 nm angeregt und im rechten Winkel zum Anregungslicht das Streulichtspektrum ermittelt. Liegt eine kohärente Streuung vor, so muß dieses Streulichtspektrum exakt mit der Wellenlängencharakteristik des Exzitationslichtes übereinstimmen.

5.3.4 Die Wellenlängenabhängigkeit der Lichtstreuung durch Intralipid^R

Mit Hilfe des Perkin-Elmer-Fluoreszenz-Spektrometers läßt sich die Intensität der Lichtstreuung durch Intralipid^R in Abhängigkeit von der Wellenlänge demonstrieren.

Die Fetteulsion wird angeregt mit Licht, das den gesamten Wellenlängenbereich zwischen 280 und 800 nm durchläuft. Parallel dazu wird die Emission der Fetteulsion wiederum im rechten Winkel zum Anregungslicht vermessen. Synchron mit der Wellenlänge des Anregungslichtes wird diesmal die Wellenlängenempfindlichkeit der Photodiode verstellt. Dadurch wird zu jeder Wellenlänge zwischen 280 und 800 nm die Intensität der Lichtstreuung rechtwinklig zum Anregungslicht erfaßt. In Abhängigkeit von der Wellenlänge wird die Streuintensität für Intralipid^R graphisch aufgetragen. Nach J. W. RAYLEIGH ist die Lichtstreuung über eine Funktion mit der Wellenlänge verknüpfbar. Die Intensität der RAYLEIGH-Streuung nimmt mit der vierten Potenz der Lichtfrequenz zu. Die Gesetzmäßigkeit sollte sich in der eigenen Messung wiederfinden lassen. Die Abweichung der gemessenen Kurve läßt indirekt wiederum Rückschlüsse auf das Absorptionsverhalten des Streumediums zu.

6. Ergebnisse

6.1 Das Hämatoporphyrinderivat

6.1.1 Die physikalischen Eigenschaften des HpD

Die mit dem Beckman-Spektrophotometer UV 5230 ermittelten Extinktionswerte des HpD in Abhängigkeit von der Wellenlänge lassen sich Tabelle 1 entnehmen:

Tabelle 1:

Wellenlänge	zugehörige Extinktion
612 nm	0,058
565 nm	0,123
535 nm	0,136
505 nm	0,166
395 nm	0,846
242 nm	0,152

Eine wellenlängen-bezogene (180 - 800 nm) Extinktionskurve des HpD zeigt die folgende Abbildung:

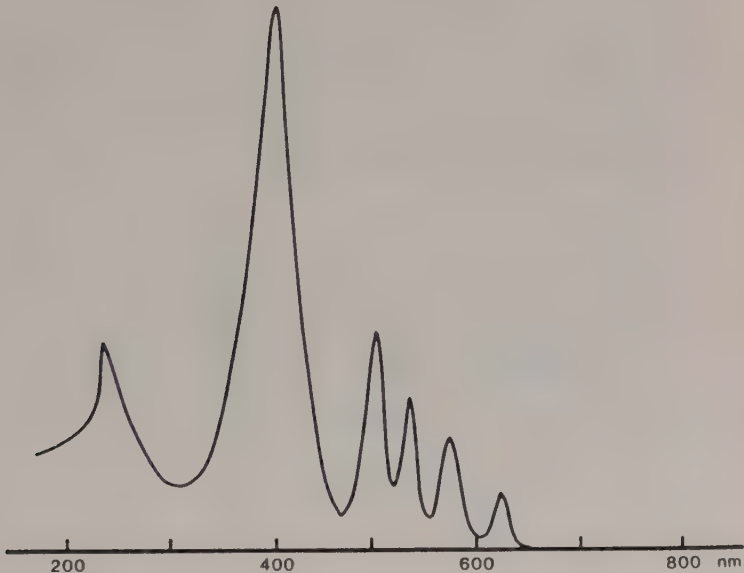


Abb. 10: Die Extinktion von HpD in Abhängigkeit von der Wellenlänge

Die den Extinktionsmaxima zugehörigen Wellenlängen weisen je nach verwendeter HpD-Charge geringfügige Abweichungen auf. Dennoch besitzen alle vermessenen Hämatoporphyrine eine ähnliche Extinktions-/Wellenlängencharakteristik, so daß die Kurve als repräsentativ für Hämatoporphyrinderivat gesehen werden kann. Die geringen Streuungen der Extinktionsmaxima

erklären sich aus der unterschiedlichen Zusammensetzung des HpD aus den verschiedenen Einzelkomponenten (siehe Allgemeiner Teil der Arbeit, Abschnitt 3.8).

Das HpD-Emissionsspektrum, vermessen mit dem Perkin-Elmer-Fluoreszenz-Spektrometer unter Anregung des HpD mit Licht der Wellenlänge 403 nm, zeigt die folgende Abbildung:

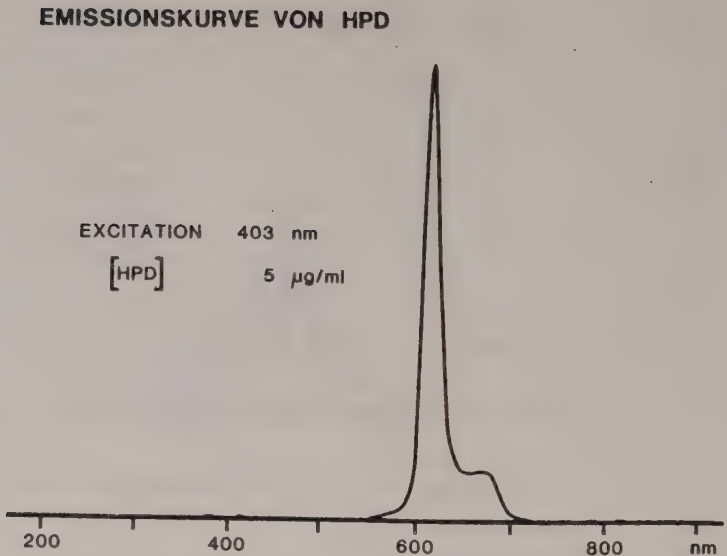


Abb. 11: HpD wird mit einer Wellenlänge von 403 nm zur Fluoreszenz angeregt. Dargestellt ist die von HpD emittierte Lichtintensität über einen Wellenlängenbereich von 200 bis 800 nm

Je nach vermessener HpD-Charge lag das Maximum der emittierten Lichtintensität zwischen 612 und 631 Nanometer. Die im Laufe der Experimente verwendeten HpD-Chargen wurden chromatographisch untersucht. Das im eigenen Labor synthetisierte HpD zeigt drei Hauptkomponenten mit den R_F -Faktoren (= Laufstrecke des analysierten Porphyrinderivates in Relation zur Lösungsmittellaufstrecke) von 0,24, 0,55 und 0,77. Diese drei Komponenten stimmen mit der in einer Arbeit von DOUGHERTY (11) beschriebenen dünn-schichtchromatographischen Analyse des Reaktionsproduktes nach LIPSON überein. Demzufolge ist die Komponente mit dem niedrigsten R_F nichtverestertes Hämatoporphyrin-Hydrochlorid. Die beiden anderen Komponenten identifiziert DOUGHERTY als Mono- bzw. Diazetat des Hämatoporphyrinderivates. Spätere Analysen käuflichen HpD's zeigen chromatographisch eine andere Zusammensetzung. Die meisten Experimente werden mit HpD der Chargennummer 11/82 963 K 11 durchgeführt. Dieses HpD zeigt in der dünn-schichtchromatographischen Auftrennung sechs deutlich voneinander trennbare Komponenten mit den R_F -Faktoren 0,12, 0,18, 0,21, 0,28, 0,39 und 0,74. Aus dem Tumor extrahiertes HpD hat den Chromatographiefaktor $R_F = 0,12$. Dieses Ergebnis deckt sich mit der in der Literatur beschriebenen Beobachtung, daß sich die unpolaren Komponenten des HpD im Tumor anreichern.



Abb. 12: Kieselgelchromatographieplatte unter ultraviolettem Anregungslicht

6.1.2 Die Pharmakokinetik des HpD, untersucht am trans-
plantierten Brown-Pearce-Tumor

Die HpD-Konzentration von 28 Kaninchen-Harnblasentumoren und den zugehörigen Normalgeweben wurde nach systemischer HpD-Gabe bestimmt. Sechs Gewebeprobenpaare mit HpD-Einwirkungszeiten von einmal 6, zweimal 12, zweimal 48 und einmal 72 Stunden gehen der quantitativen HpD-Bestimmung durch technische Fehler verloren. Über die Analysen von 22 Kaninchen kann eine sichere Aussage getroffen werden. Die mehrmalige Wiederholung der Gewebsanalysen bei größeren Gewebsstücken ergibt eine maximale Streubreite von 16 %. Größere Streubreiten der im folgenden beschriebenen Experimente müssen der biologischen Schwankungsbreite zugeordnet werden, dürfen also nicht der HpD-Bestimmungsmethode angelastet werden.

Vier Kaninchen werden ohne vorherige HpD-Gabe analysiert, um eine Basisfluoreszenz - vor allem verursacht durch Abbauprodukte des Blutes, aber auch Cytochrome und ähnliche Verbindungen - von der HpD-Fluoreszenz abzuziehen.

Die Basisfluoreszenz HpD-freier Proben ergibt folgende Werte:

- Kaninchen 1: 0,18 µg pro Gramm Normalgewebe;
0,38 µg pro Gramm Tumor;
- Kaninchen 2: 0,16 µg pro Gramm Normalgewebe;
2,13 µg pro Gramm Tumor;
- Kaninchen 3: 2,57 µg pro Gramm Normalgewebe;
transplantierte Tumor im Tier nicht ange-
gangen;
- Kaninchen 4: 1,10 µg pro Gramm Normalgewebe;
Tumor so nekrotisch, daß eine Analyse nicht
möglich war; stattdessen wurde eine stark
durchblutete Lungenmetastase analysiert mit
dem Wert 6,8 µg pro Tumor.

Die Basisfluoreszenzausbeute wird gemittelt. Wenngleich aufgrund der geringen Fallzahl und nichtvorhandenen Gauss-Verteilung statistisch nicht einwandfrei, wird zur Veranschaulichung der Streubreite die Standardabweichung gebildet. Die mittlere Basisfluoreszenz über alle Werte ergibt einen Mittelwert von $1,08 \mu\text{g}/\text{Gramm}$ bei einer "Standardabweichung" von $SD = 1,17$.

Um den Einfluß der Gewebedurchblutung auf die Analysen zu erfassen, wird Blut vermessen, das den gleichen biochemischen Darstellungsprozeß durchlaufen hat. Diese Bestimmung ergibt einen Wert von $17,17 \mu\text{g}$ Porphyrin pro Milliliter analysierten Blutes. Geht man von der groben Annahme aus, daß der Säugetierorganismus zu 7 % aus Blut besteht, resultiert daraus, daß die Gewebedurchblutung mit $0,07$ mal $17,17 = 1,2 \mu\text{g}$ Porphyrin in die Analyse mit eingeht. Die im Mittel gemessene Basisfluoreszenz von $1,08 \mu\text{g}$ Porphyrin pro Gramm Gewebe dürfte somit durch die Organdurchblutung zustande kommen.

Von dieser Messung ausgehend, ist es für die nun folgenden HpD-Fluoreszenzwerte gerechtfertigt, den Basiswert von $1,08$ von den gemessenen Werten abzuziehen. Außerdem können unter Berücksichtigung des Maximums der Basisfluoreszenz von $2,57 \mu\text{g}$ Porphyrin pro Gramm Gewebe alle gemessenen Werte die kleiner oder gleich $2,57 - 1,08 = 1,49$ im Rahmen der methodischen Streubreite als Null betrachtet werden. Von 18 untersuchten Tumoren nach systemischer HpD-Gabe zeigen fünf (= 28 %) unter den oben geschilderten Gesichtspunkten sicher keine HpD-Anreicherung. Diese transplantierten Tumoren haben offensichtlich nicht die Tendenz, HpD im Rahmen der Meßgenauigkeit einzulagern. Diese fünf Tumoren waren unterschiedlichen HpD-Einwirkungszeiten ausgesetzt, mit je einmal 6, 12, 24 und zweimal 48 Stunden. Alle anderen Tumoren zeigen eine deutliche HpD-Anreicherung. Der folgenden Wertetabelle können die absoluten HpD-Konzentrationen der Tumoren und der jeweils zugehörigen gesunden Harnblase in Abhängigkeit zur

HpD-Einwirkungszeit entnommen werden. Den Kaninchen wurden 5 mg HpD pro Kilogramm Körpergewicht intravenös verabreicht.

In der Tabelle sind die Konzentrationsangaben der Tumoren, die HpD nicht anreichern, in Klammer angegeben und bei der Mittelwertbildung nicht berücksichtigt worden.

In der folgenden Abbildung sind die ermittelten Konzentrationswerte von HpD im Tumorgewebe den Werten des gesunden Gewebes gegenübergestellt und in Abhängigkeit von der HpD-Einwirkungszeit graphisch aufgetragen.

Tabelle 2:

HpD-Einwirkungszeit in Stunden	HpD-Konzentration im gesunden Gewebe µg HpD pro Gramm analysiertem Gewebe	HpD-Konzentration im Tumorgewebe µg HpD pro Gramm analysiertem Gewebe
6	4,87	27,45
6	8,54	28,65
6	1,68	(1,08)
Mittelwerte	5,00	28,05
Standardabweichung	3,43	0,84
12	(0,32)	(0,49)
12	1,46	15,36
12	1,41	3,59
Mittelwerte	1,44	9,48
24	1,41	3,59
24	0,90	8,98
24	1,70	8,05
24	1,43	6,41
24	0,52	(1,30)
24	2,01	18,50
Mittelwerte	1,32	9,10
Standardabweichung	0,53	5,63
48	0,40	(0,16)
48	0,86	(0,32)
48	0,58	1,71
48	2,00	16,34
Mittelwerte	0,81	9,05
Standardabweichung	0,86	10,34
72	0,047	8,66
96	0,41	7,51
96	2,35	3,21
Mittelwerte	1,38	5,36
Standardabweichung	1,37	3,04

Pharmakokinetik des HpD beim Kaninchen

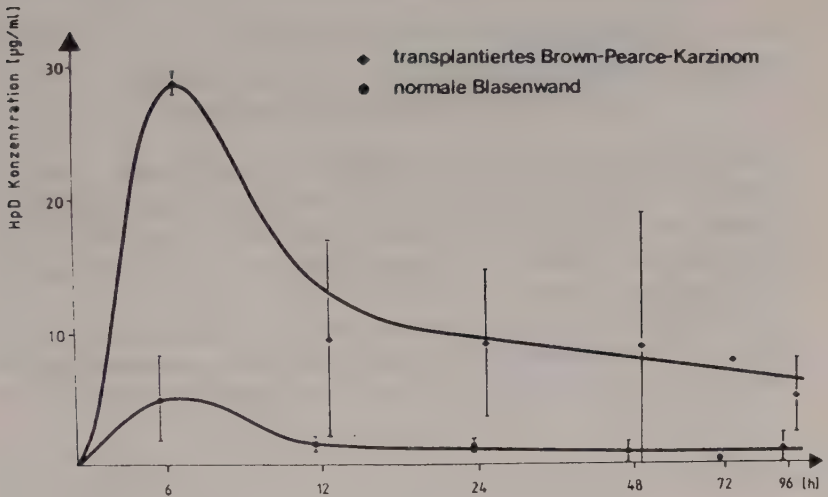


Abb. 13: In Abhängigkeit von der Zeit ist der Konzentrationsverlauf von HpD im gesunden sowie im Tumorgewebe aufgetragen; HpD i.v. (5 mg/kg KG).

Zwei Dinge lassen sich verdeutlichen:

1. Im gesunden Blasengewebe ist HpD nur bis zu sechs Stunden nach HpD-Gabe nachweisbar. Bereits zwölf Stunden nach systemischer HpD-Gabe ist die Kaninchenblase weitestgehend von Hämatoporphyrinderivat geklärt.
2. Die HpD-Konzentration im Tumor steigt ebenfalls bis zur sechsten Stunde nach HpD-Gabe an. Der anschließende Konzentrationsabfall ist jedoch wesentlich langsamer als im gesunden Blasengewebe. Zwölf Stunden nach systemischer HpD-Gabe ist der transplantierte Brown-Pearce-

Tumor ausreichend photosensibilisiert und das gesunde Harnblasengewebe soweit von HpD geklärt, daß Laserlicht zu therapeutischen Zwecken angewendet werden kann.

6.1.3 Die Pharmakokinetik des HpD, untersucht am
nitrosamininduzierten Tumor der Ratte

Insgesamt werden 46 Ratten untersucht. Davon sind 16 Ratten tumorfrei, um den Vergleich mit gesundem Blasengewebe zu ermöglichen. Zwei dieser tumorfreien Ratten erhalten kein HpD und dienen damit als Kontrollgruppen bzw. zur Erfassung der Basisfluoreszenz des Gewebes.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die HpD-Konzentrationen im tumorfreien Harnblasengewebe der Ratte. Die HpD-Einwirkungszeiten liegen zwischen drei und 120 Stunden.

Tabelle 3:

Ratte	HpD-Einwirkungszeit	HpD-Konzentration im gesunden Gewebe µg HpD pro Gramm analysiertem Gewebe	
1	kein HpD	(1,55)	
2	kein HpD	(0,69)	
Mittelwert		(1,12)	
3	3	2,35	weiblich
4	3	1,19	weiblich
5	3	2,46	männlich
Mittelwert		2,00	
Standardabweichung		0,70	
6	6	1,08	weiblich
7	6	1,49	männlich
Mittelwert		1,29	
Standardabweichung		0,29	
8	12	0,98	weiblich
9	12	0,65	männlich
Mittelwert		0,81	
Standardabweichung		0,23	
10	24	1,47	weiblich
11	24	1,40	weiblich
Mittelwert		1,43	
Standardabweichung		0,05	
12	48	1,09	männlich
13	72	1,86	weiblich
14	72	1,76	weiblich
Mittelwert		1,81	
Standardabweichung		0,07	
15	96	1,18	männlich
16	120	1,12	weiblich

Wie ersichtlich, beträgt die Fluoreszenz für HpD-freie Proben im Mittel 1,12 µg Porphyrin pro Gramm Gewebe mit einem Maximalwert von 1,55. Als Konsequenz hieraus ergibt sich, daß nur die Werte größer als 1,55 als HpD-Fluoreszenz zu betrachten sind. HpD ist demzufolge nur während der ersten drei Stunden nach HpD-Gabe im gesunden Blasengewebe nachweisbar. Nach spätestens sechs Stunden ist die gesunde Harnblase aber wieder frei von HpD.

Im folgenden werden 30 tumortragende Ratten untersucht. Drei tumortragende Rattenharnblasen dienen als HpD-freie Kontrolle. Dabei ergeben sich folgende Werte:

Ratte 1:	2,93 µg HpD pro Gramm Tumor
Ratte 2:	1,55 µg HpD pro Gramm Tumor
Ratte 3:	0,175 µg HpD pro Gramm Tumor
Mittelwert:	1,55 µg HpD pro Gramm Tumor
Standardabweichung:	1,38

Der Basispeak beträgt beim Blasentumor demnach 1,55. Dieser Wert wird wiederum von allen Proben abgezogen. Aus dem Extremwert von 2,93 folgt, daß im folgenden alle Werte kleiner/gleich $2,93 - 1,55 = 1,38$ als HpD-frei gesehen werden können.

Im folgenden sind die Konzentrationangaben für HpD im nitrosamininduzierten Rattentumor - wiederum mit unterschiedlichen HpD-Einwirkungszeiten - aufgeführt.

Tabelle 4:

Ratte	HpD-Einwirkungszeit	HpD-Konzentration im Tumor in µg/Gramm Tumor
4	1,5	1,07 (Tumor sehr groß)
5	1,5	0,92 (Tumor sehr groß)
	Mittelwert	1,00
	Standardabweichung	0,11
6	3	0,95
7	3	6,26
8	3	8,64
	Mittelwert	5,28
	Standardabweichung	3,94
9	6	15,16
10	6	11,96
11	6	15,26
	Mittelwert	14,13
	Standardabweichung	1,88
12	12	6,81 (Tumor sehr groß)
13	12	3,03 (Tumor sehr groß)
14	12	8,06
15	Mittelwert	6,54
	Standardabweichung	2,43
16	17	3,03 (Tumor sehr groß)
17	17	5,26
18	17	4,31
19	17	11,94
	Mittelwert	6,13
	Standardabweichung	3,98
20	24	14,82
21	24	3,60
22	24	6,17
	Mittelwert	8,20
	Standardabweichung	5,88
23	48	0,29
24	55	3,64 (Tumor sehr groß)
25	55	1,14 (Tumor sehr groß)
	Mittelwert	2,30
	Standardabweichung	1,64
26	72	1,91
27	72	2,42
28	72	2,05
29	72	2,70
	Mittelwert	2,27
	Standardabweichung	0,36
30	144	2,70

In der folgenden Abbildung sind die Versuchsergebnisse graphisch aufgetragen. In Abhängigkeit von der HpD-Einwirkungs-
dauer sind die Konzentrationen von HpD im Tumor denen des
gesunden Harnblasengewebes gegenübergestellt:

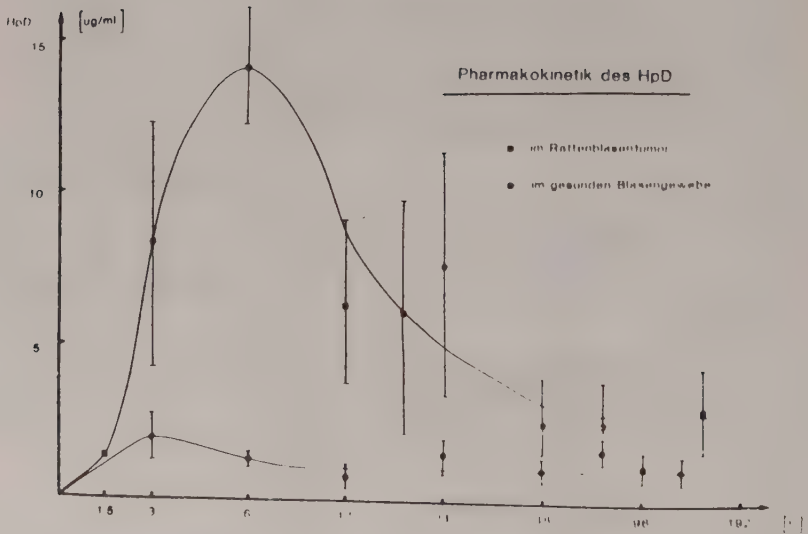


Abb. 14: Der Konzentrationsverlauf von HpD in Abhängigkeit von der Zeit nach HpD-Gabe. Gegenübergestellt ist der Konzentrationsverlauf im Rattenblasentumor und gesunden Rattenblasengewebe. Jede Ratte bekam 10 mg HpD i.v.

6.2 Zellkulturversuche

6.2.1 Die Vitalität photosensibilisierter und nachfolgend bestrahlter Brown-Pearce-Zellen, ermittelt durch Trypan-Blau-Färbung

Die Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen an 100 Lab-Tek-Platten mit je acht Einzelfeldern, d. h. 800 Einzelwerten. Modifiziert wurden bei diesen Versuchen drei Parameter: HpD-Konzentration, Bestrahlungsdauer und Bestrahlungsleistung. Die Zusammenfassung der ersten orientierenden Experimente zeigt die nachfolgende Abbildung:

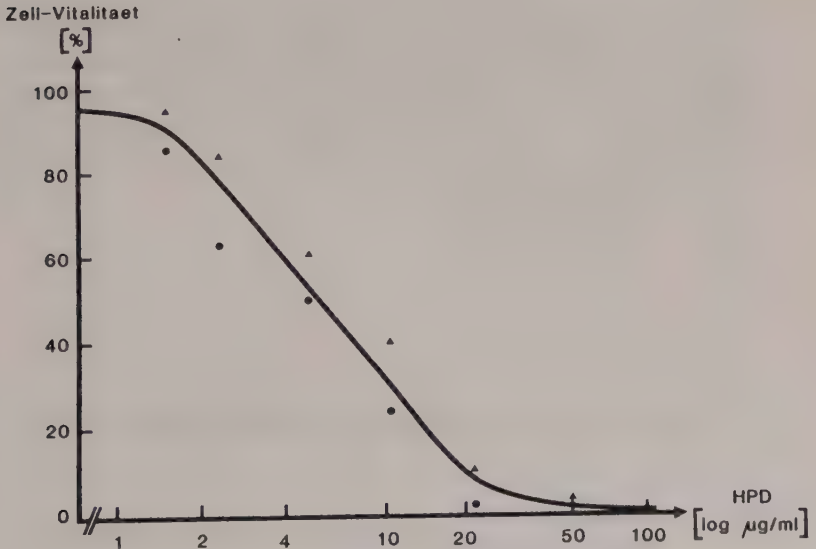


Abb. 15: Die Zellvitalität einer mit 13,2 Joule bestrahlten Zellkultur, die mit HpD im Konzentrationsbereich von 1 µg - 100 µg/ml sensibilisiert ist.

Verwendung fand hierbei das im eigenen Labor synthetisierte HpD. Mit einer Bestrahlungsenergie von $13,2 \text{ Joule/cm}^2$, erreicht durch eine Bestrahlungsdauer von fünf Minuten mit 700 mW , lassen sich die Zellen ab einer HpD-Konzentration von 50 µg/ml völlig devitalisieren. Es ist zu vermuten, daß mit der Anwendung höherer Bestrahlungsenergien eine Zellschädigung bei wesentlich niedrigeren HpD-Konzentrationen möglich sein müßte. Deshalb werden im Rahmen der folgenden Versuchsserie die Auswirkung einer Rotlichtbestrahlung mit 120 Joule/cm^2 bei HpD-Konzentrationen zwischen 10 Picogramm bis 100 Mikrogramm pro Milliliter Nährmedium überprüft.

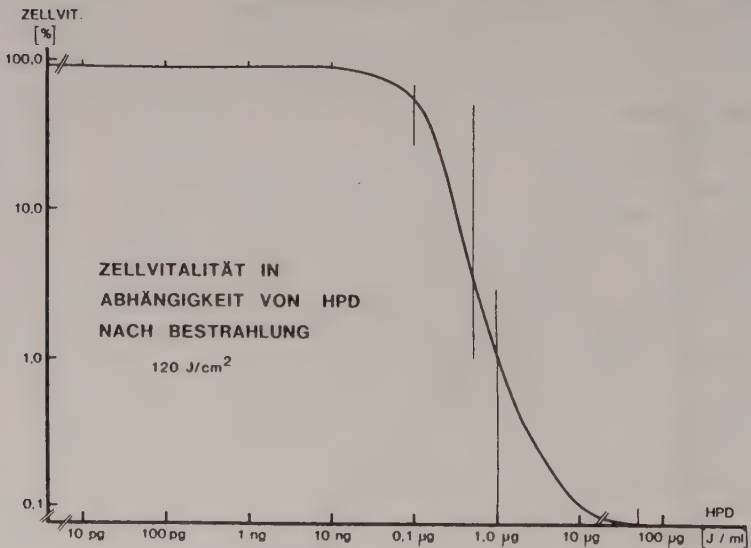


Abb. 16: Vitalität von Zellen, die mit HpD unterschiedlicher Konzentration ($10 \text{ pg} - 100 \text{ µg/ml}$) photosensibilisiert und mit einer Lichtenergie von 120 Joule/cm^2 bestrahlt wurden.

Die HpD-abhängige Zellschädigung zeigt eine ähnliche Charakteristik wie die des ersten Experimentes. Eine genaue Analyse der Kurven ergibt, daß die für eine bestimmte zytotoxische Wirkung der PRT erforderliche Bestrahlungsenergie reziprok proportional der notwendigen HpD-Konzentration ist: Eine um einen bestimmten Faktor höhere HpD-Konzentration ermöglicht bei gleichbleibender zytotoxischer Auswirkung eine Bestrahlungsenergie-Einsparung um den gleichen Faktor und umgekehrt.

Weiterhin fällt auf, daß in den HpD-Konzentrations-/Bestrahlungsenergiebereichen, die zu ca. 50 %iger Zellabtötung führen, eine große Streuung der Versuchsergebnisse auftritt, während die Bereiche völliger Devitalisierung ebenso wie die ohne zytotoxische Wirkung bei der Wiederholung der Experimente sehr geringe Streubreiten zeigen.

In den folgenden Experimenten werden die Bereiche genauer untersucht, die zu ca. 50 % zum Zelltod führen.

Die nächste Abbildung zeigt die Auswirkung einer in-vitro-Photoradiotherapie mit HpD-Konzentrationen zwischen 5 und 50 µg HpD pro ml und Bestrahlungsenergien von 3,3 bis 33 Joule/cm².

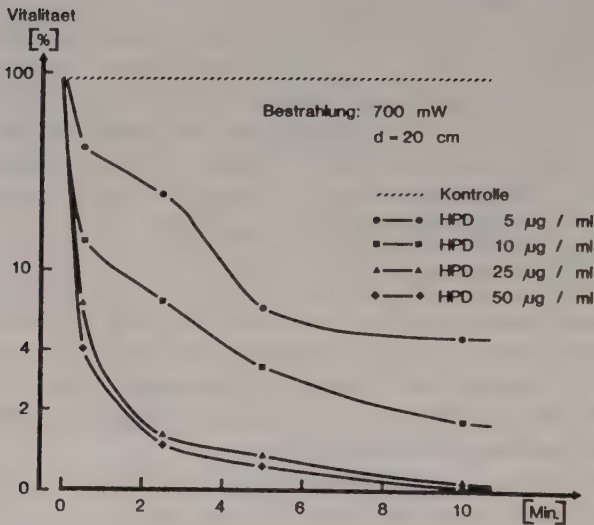


Abb. 17: In Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit ist die Vitalität von Zellen aufgetragen, die mit HpD-Konzentrationen von 5 - 50 µg/Milliliter Kulturmedium photosensibilisiert worden waren.

Auch diese Experimente wurden mit dem selbst synthetisierten HpD durchgeführt. Auffällig ist, daß nur HpD-Konzentrationen von mindestens 25 µg/ml in Verbindung mit 33 Joule pro cm² zu völligem Zelltod führen. Niedrigere Konzentrationen bzw. Bestrahlungsenergien zeigen immer wieder das Überleben einzelner Zellen. Bemerkenswert ist dabei, daß diese überlebenden Zellen immer frei, also ohne Kontakt mit den Nachbarzellen liegen. Der Zellkontakt spielt eine wichtige Rolle bei dem Grad der Photosensibilisierung.

Die nun folgende Versuchsserie soll Auskunft geben über die Empfindlichkeit der Brown-Pearce-Zellen auf die Laserlichtbestrahlung ohne vorherige Photosensibilisierung. Zum besseren Wirkungsvergleich werden im Rahmen dieser Versuchsserie Zellen mitbestrahlt, die mit kommerziell erhältlichem HpD mit Konzentrationen von 5 bzw. 50 $\mu\text{g/ml}$ photosensibilisiert wurden. Das Ergebnis dieses Experiments zeigt die folgende Abbildung:

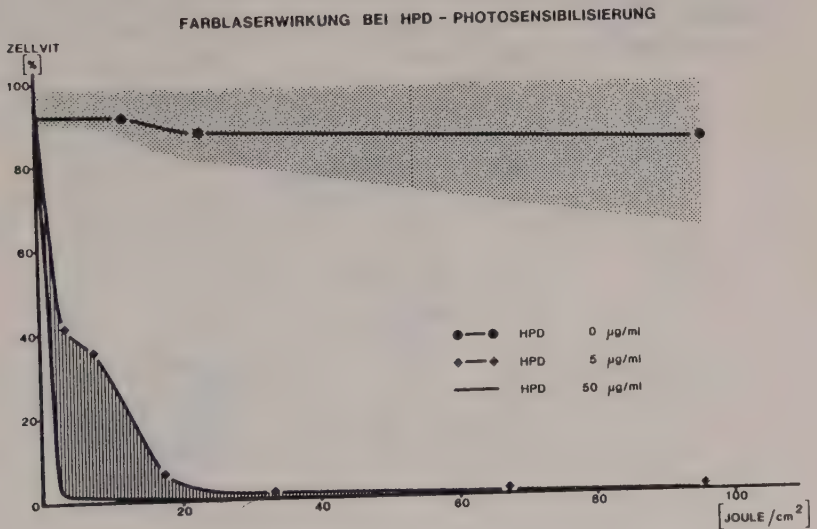


Abb. 18: In Abhängigkeit von der Bestrahlungsenergie ist die Zellvitalität von nicht-photosensibilisierten Zellen dem Vitalitätsverlauf photosensibilisierter Zellen gegenübergestellt.

Im Mittel zeigt die Laserbestrahlung von nichtphotosensibilisierten Zellen wenig Einfluß auf die Zellvitalität. Bei der Anwendung extrem hoher Bestrahlungsdosen von 100 Joule/cm² lassen sich in einem Experiment 32 % der Zellen devitalisieren. Die mittlere Zellabsterberate beträgt aber selbst angesichts dieser hohen Bestrahlungsdosis nur ca. 7 %. Dahingegen zeigen die Vitalitätskurven der photosensibilisierten Zellen einen deutlichen Unterschied gegenüber den HpD-freien Zellkurven.

Von besonderem Interesse ist bei diesem Experiment jedoch auch der Vergleich mit den vorangegangenen Versuchen. Die letzte Studie wurde mit kommerziell erhältlichem HpD durchgeführt. Dieses käufliche HpD ist wirksamer als das im eigenen Labor hergestellte HpD. Die weiteren Experimente werden deshalb nicht mehr mit selbst synthetisiertem HpD durchgeführt.



Abb. 19: Eine HpD-freie Zellkultur wurde mit 50 J/cm^2 bestrahlt. Nahezu keine Zelle färbt sich mit Trypanblau an - fast alle sind demnach vital.

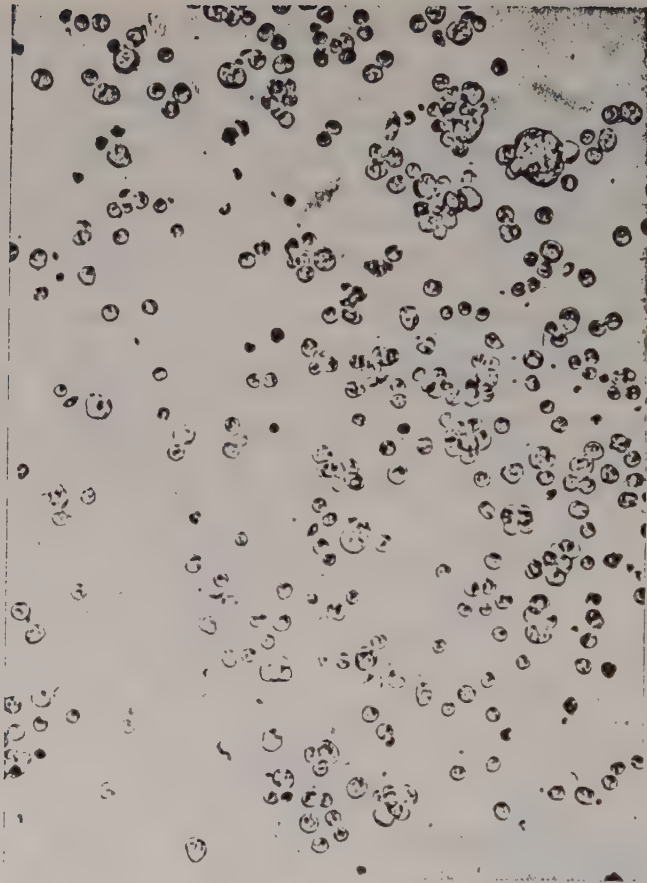


Abb. 20: Durch eine Bestrahlung mit 5 J/cm^2 sind einige der mit $5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ photosensibilisierten Zellen abgetötet.

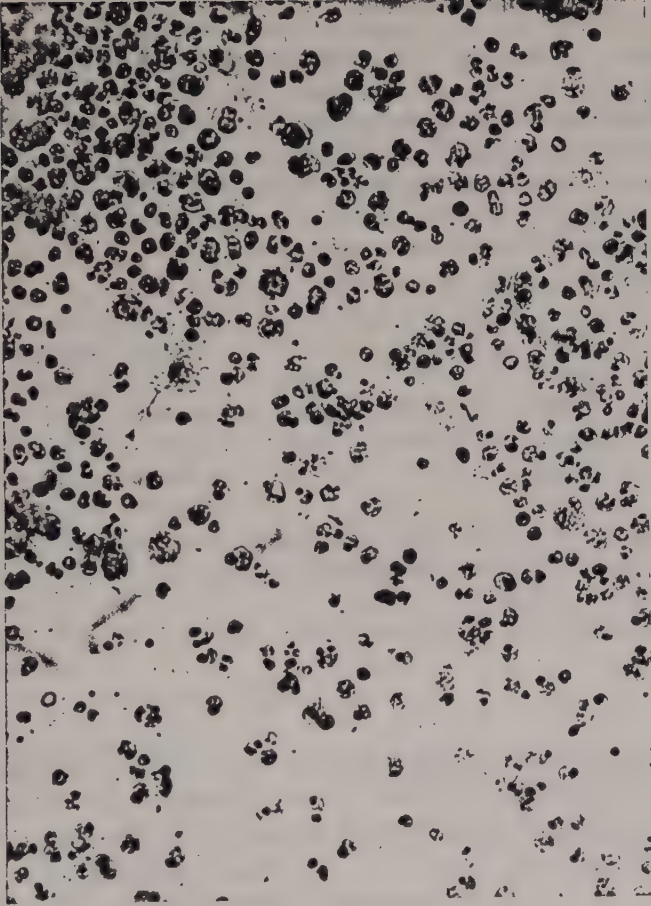


Abb. 21: Eine Bestrahlung mit 35 J/cm^2 devitalisierte alle Zellen, nachdem diese mit $5 \text{ }\mu\text{g/ml}$ photosensibilisiert worden waren.

6.2.2 Experimente zur Zellverdopplungszeit von
Brown-Pearce-Zellen

Für die Experimente zur fraktionierten Bestrahlung von Zellkulturen ist es von Interesse, die Zellverdopplungszeit zu kennen: In einem Experiment wurden 20 Petrischalen mit einer Zelldichte von 10^3 Zellen bebrütet. Täglich wurden vier Petrischalen gespült und mit Trypsin behandelt. Sobald alle Zellen aus der Petrischale abgelöst waren, wurden die Zellen in einer Zählkammer ausgezählt.

Die Tabelle 5 zeigt das Ergebnis:

1. Tag	1200	1100	1000	1500	Zellen
2. Tag	2600	3300	2500	6000	Zellen
3. Tag	5000	6700	8700	12000	Zellen
4. Tag	14000	19000	26000	26000	Zellen
5. Tag	(22000)	40000	(27000)	(41000)	Zellen

Die Zahlen folgen einer exponentiellen Wachstumskurve. Einzig die in Klammer befindlichen Zahlen bilden dabei eine Ausnahme.

Die Wachstumskurve wird beschrieben von der Formel

$$N_n = N_0 \cdot 2^{\frac{24n}{t}}$$

Mit N_0 gleich der Ausgangszellzahl, N_n gleich der zum Tag n gezählten Zellzahl und t der Verdopplungszeit. Die Zellverdopplungszeit errechnet sich hieraus zu 17,28 Stunden.

6.2.3 Die zytotoxische Auswirkung einer fraktionierten Bestrahlung

Drei Bestrahlungsserien wurden zur Fraktionierung der Laserbestrahlung durchgeführt. Die Bestrahlungsintervalle betrugen 12 bzw. 24 Stunden. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Versuchsergebnisse:

Tabelle 6:

	Serie 1	Serie 2	Serie 3
Bestrahlungsintervalle:	12 h	24 h	24 h
Bestrahlungsdauer:	1 min	1 min	20 min
Bestrahlungsleistung je Einzelbestrahlung:	0,2 Watt	0,2 Watt	1,2 Watt
HpD-Konzentration:	5 µg/ml	2,5 µg/ml	0,1 µg/ml
Ausgangsvitalität:	92 %	90 %	99 %
Zellvitalität nach der			
1. Bestrahlung:	36 %	50,5 %	95 %
2. Bestrahlung:	4,5 %	18,5 %	39 %
3. Bestrahlung:	4,25 %	4,5 %	28 %
4. Bestrahlung:	1,0 %	0,5 %	0 %
5. Bestrahlung:	0 %	0 %	-
Vitalität HpD-freier Kontrollen:	92 %	90 %	60 %
Gesamtbestrahlungsenergie:	4,7 J/cm ²	4,7 J/cm ²	458 J/cm ²

Im Rahmen der ersten Serie konnte durch Anwendung einer Gesamtbestrahlungsenergie von 4,7 J/cm² eine Zellkultur, nachdem sie mit 5 µg HpD/ml photosensibilisiert war, völlig devitalisiert werden. Derselbe Energiebetrag in Form einer Einzelbestrahlung vermag nur 72 % der Zellen abzutöten. Die HpD-Konzentration von 2,5 µg/ml führt bei einer Einzelbestrahlung mit der Energie von 4,7 J/cm² nur zu einer Devitalisation der Zellen von 56 %. Die Anwendung von fünf Einzelbestrahlungen jedoch mit einer Gesamtenergie von 4,7 J/cm² ist bei der gleichen HpD-Konzentration für alle Zellen zytotoxisch.

Eine Zellkultur mit einer HpD-Konzentration von nur 100 ng HpD pro ml Nährmedium läßt sich mit vier Bestrahlungen von insgesamt 458 J/cm² völlig abtöten. Jedoch werden auch 40 % der nicht photosensibilisierten Zellen von einer derart hohen Bestrahlungsenergie getroffen.

Zusammenfassend konnte in diesem in-vitro-Experiment eine ganz beachtliche Wirkungssteigerung der Photoradiotherapie durch Fraktionierung der Bestrahlung aufgezeigt werden.

6.2.4 Der Vitalitätsverlauf photosensibilisierter Brown-Pearce-Zellen, ermittelt durch Markierung mit ³H-Thymidin

Drei Mikrotiterplatten mit je 96 Einzelfeldern werden ausgewertet. Entsprechend der bereits beschriebenen Methode wird die Szintillationsrate der Einzelmessung in den entsprechenden Vitalitätswert umgerechnet.

In der nachfolgenden Abbildung wird der Vitalitätsverlauf der Zellen in Abhängigkeit von der verwendeten HpD-Konzentration dargestellt:

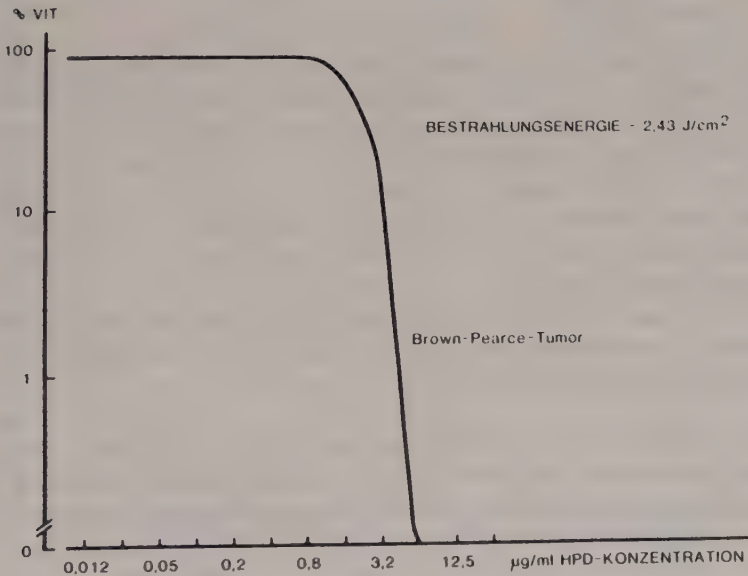


Abb. 22: Bestrahlung von Brown-Pearce-Zellen mit einer Bestrahlungsenergie von 2,43 J/cm². Die Zytotoxizität ist in Abhängigkeit von der verwendeten HpD-Konzentration dargestellt.

Der Vitalitätsverlauf in Abhängigkeit von der HpD-Konzentration besitzt eine ähnliche Charakteristik wie die Vitalitätskurven, die durch Verwendung des Trypan-Blau-Testes ermittelt wurden. Werden äquivalente Bestrahlungsdosen und HpD-Konzentrationen in ihrer Auswirkung auf die Zellen mit den beiden Vitalitätstests ³H-Thymidin-Methode bzw. Trypan-Blau-Färbung verglichen, so zeigt der ³H-Thymidin-Test eine stärkere Zellschädigung durch die Photoradiotherapie als die Trypan-Blau-Methode.

6.2.5 Ergebnisse der in-vitro-Bestrahlung von humanen
Blasenkarzinomzellen im Vergleich zum Verhalten
gesunder Urothelzellen nach Photosensibilisierung
mit HpD

Unter Verwendung der Trypan-Blau-Färbung wurden menschliche Blasentumorzellen sowie gesunde humane Urothelzellen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber der Photoradiotherapie untersucht. In der nächsten Abbildung ist eine Zusammenfassung dieser Versuchsergebnisse dargestellt.

Die linke Abbildung enthält in Abhängigkeit von der HpD-Konzentration den Zellvitalitätsverlauf von vier Bestrahlungsserien zwischen 0,24 und 19,2 J/cm². Analog sind auf der rechten Seite der Abbildung drei Bestrahlungsserien humaner Blasenkarzinomzellen dargestellt, wiederum mit Bestrahlungsenergien zwischen 0,24 und 19,2 J/cm².

Zwei Auffälligkeiten sind bei der Bestrahlungsserie des Blasenkarzinoms besonders hervorzuheben. Durch keine Maßnahme läßt sich bei den menschlichen Blasenkarzinomzellen die Ausgangsvitalität der Zellen vor Versuchsbeginn über 78 % anheben. Die Vitalitätskurven der Blasenkarzinomzellen sind deshalb nur bedingt mit denen gesunder Urothelzellen vergleichbar.

Weiterhin fällt auf, daß bereits die Laserbestrahlung allein, ohne vorherige Photosensibilisierung mit HpD, eine toxische Wirkung auf die Blasenkarzinomzelle hat.

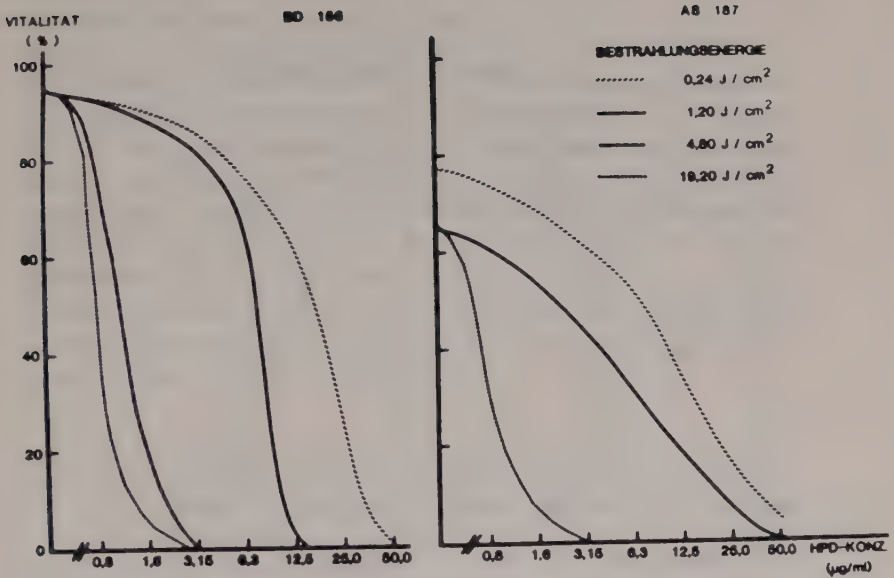


Abb. 23: Bestrahlung von gesunden Blasenurothelzellen (linke Seite der Abb.), sowie Bestrahlung von menschlichen Blasenkarzinomzellen (rechte Seite)

6.2.6 Dosiswirkungsvergleich der drei Zelllinien:
Brown-Pearce-Zellen, gesundes Blasenurothel
und Blasenkarzinomzellen

Die Auswirkung einer Laserlicht-Bestrahlung mit der Energiedichte von $1,2 \text{ J/cm}^2$ auf die drei genannten Zelllinien werden im Experiment verglichen. Die Bestrahlungsenergie wurde in einer Größenordnung gewählt, die aufgrund ihrer resultierenden, flachen Vitalitätskurvenverläufe bei allen drei Zelllinien eine gute Vergleichbarkeit erwarten lässt.

In der nachfolgenden Abbildung sind die Ergebnisse dieses Versuchs dargestellt:

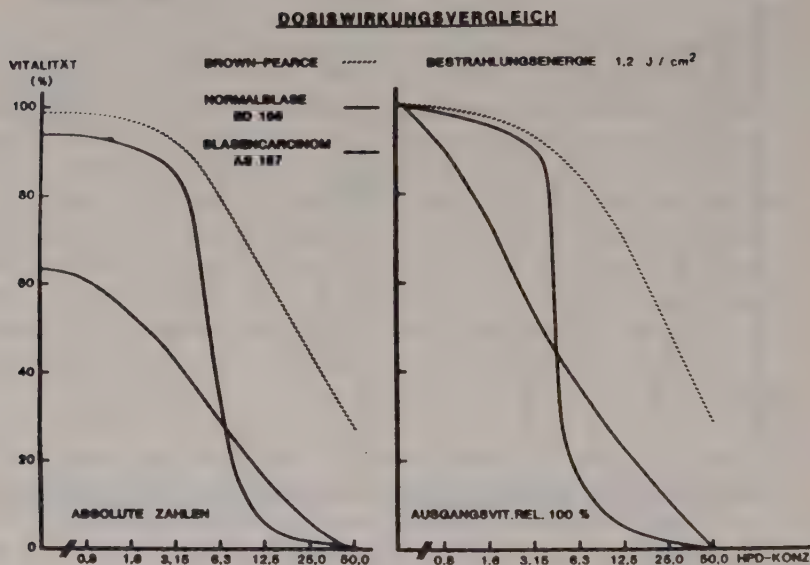


Abb. 24: Dosiswirkungsvergleich zwischen B.P.-, gesunden und entarteten humanen Zellen

Die linke Hälfte der Abbildung zeigt in Abhängigkeit zur HpD-Konzentration die zugehörigen Vitalitätskurven der drei Zelllinien. Deutlich läßt sich anhand der Vergleichskurven die Unempfindlichkeit der Brown-Pearce-Zellen gegenüber der Photoradiotherapie aufzeigen. Bemerkenswert ist auch der steile Kurvenverlauf beim menschlichen Blasenurothel. Auf der rechten Seite der Abbildung wird versucht, durch Umrechnung der Ausgangsvitalität der drei Kurven auf 100 % und

proportional dazu der restlichen Werte die Vergleichbarkeit der Vitalitätskurven zu verbessern.

Aus den Abbildungen geht hervor, daß die Vitalitätskurven der beiden Karzinom-Zelllinien in etwa parallel verlaufen. Das menschliche Blasenkarzinom spricht wesentlich empfindlicher auf die Photoradiotherapie an als der Brown-Pearce-Tumor. Das gesunde menschliche Urothel hingegen zeigt eine wesentlich steilere Kurvencharakteristik. Im Rahmen der Zellkulturrhaltung erweisen sich diese Urothelzellen als außerordentlich empfindlich.

Weitere Experimente zur Suche nach zellspezifischen Differenzierungsmechanismen in Bezug auf die Photosensibilisierung mit HpD werden unternommen.

6.2.7 Versuchsergebnisse zur HpD-Ausschleusung aus der Zelle - Vergleiche zwischen gesunden und entarteten Zellen

Im Rahmen dieser Experimente sollte untersucht werden, ob nach Entfernung des extrazellulären HpD's der Photosensibilisierungsgrad der Tumorzellen zeitabhängig ein anderes Verhalten aufweist, als der gesunder Harnblasenzellen. Aus der nachfolgenden Abbildung geht das Verhalten gesunder Blasenurothelzellen auf das Auswaschen des Nährmediums und damit der HpD-haltigen Extrazellular-Flüssigkeit mit HpD-freiem Nährmedium hervor.

BESTRAHLUNG VON HUMANEN NORMALEN BLASENZELLEN BD 150

BESTRAHLUNGSENERGIE $4,0 \text{ J / cm}^2$

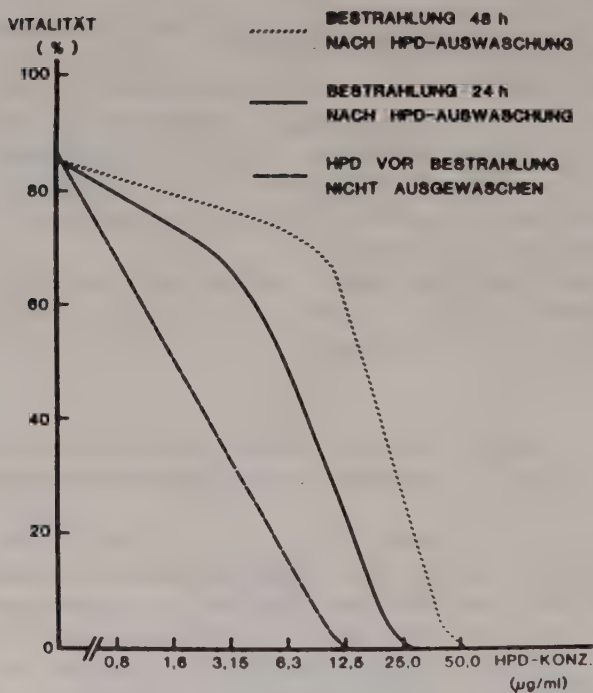


Abb. 25: Abnahme des Photosensibilisierungsgrades bei HpD-freiem extrazellulärem Medium in Abhängigkeit von der Zeit, ermittelt an humanen nichtentarteten Blasenellen

Aus den drei Kurven wird ersichtlich, daß der Photosensibilisierungsgrad gesunder Blasenurothelzellen pro Tag etwa um den Faktor 2 abnimmt, wenn im extrazellulären Medium kein

HpD mehr vorhanden ist. Die gesunde Zelle gibt also mit einer bestimmten Geschwindigkeit das intrazelluläre (oder membranboundene) HpD wieder ab. Es stellt sich die Frage, ob entartete Zellen ein ähnliches Verhalten im Rahmen dieses Experimentes zeigen.

Im folgenden Versuch fanden wiederum der Brown-Pearce-Tumor Verwendung unter der Annahme, daß sich dieser Tumor aufgrund seines niedrigen Differenzierungsgrades sowie seines schnellen Wachstums am deutlichsten von der gesunden Urothelzelle unterscheidet. Das Versuchsergebnis zeigt die nachfolgende Abbildung 26:

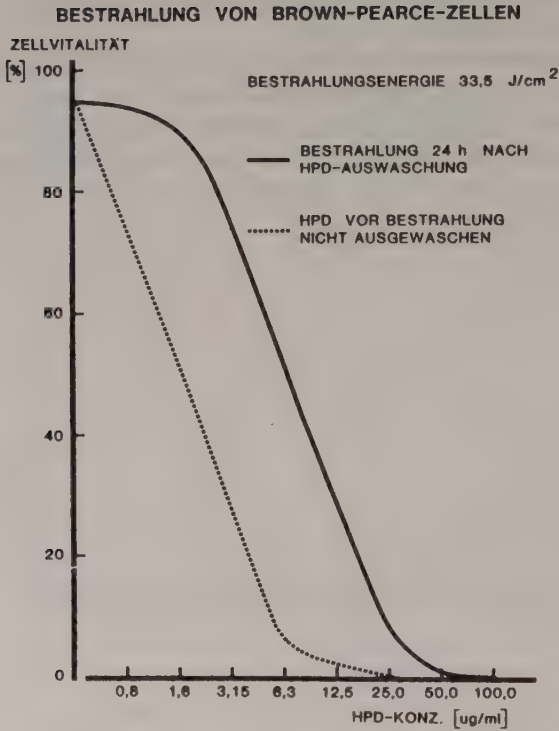


Abb. 26: Abnahme des Photosensibilisierungsgrades bei HpD-freiem extrazellulärem Medium in Abhängigkeit von der Zeit, ermittelt an Brown-Pearce-Zellen.

Auch die Brown-Pearce-Zellen weisen ein ähnliches Verhalten auf wie die menschlichen gesunden Urothelzellen. Soweit bei diesem Experiment die Aussage über intrazelluläres HpD aufgrund des Grades der Photosensibilisierung gegenüber Licht möglich ist, läßt sich anhand dieser beiden Kurven aufzeigen, daß zwischen beiden Zellarten kein Unterschied im Gehalt von HpD nach HpD-Gabe steht.

So ist dieses Versuchsergebnis ein weiteres Indiz dafür, daß Unterschiede im pharmakokinetischen Verhalten zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe in extrazellulären Mechanismen zu suchen sind. Im Laufe der Arbeit soll diese Vermutung noch durch weitere Experimente erhärtet werden (siehe Abschnitt 6.2.10).

6.2.8 Vergleichende Untersuchungen von Brown-Pearce-Zellen und menschlichen Blasentumorzellen mit Hilfe der ^3H -Thymidin-Markierung zur Vitalitätstestung

Die Ungenauigkeit des Vitalitätstestes mit Trypan-Blau macht es erforderlich, ergänzende Experimente mit ^3H -Thymidin durchzuführen. Die Anwendung des ^3H -Thymidintestes auf gesunde menschliche Urothelien ist nicht möglich, da diese Zellen infolge ihres wesentlich langsameren Wachstums gegenüber den Tumorzellen ^3H -Thymidin nur sehr langsam einbauen. Im Rahmen einiger orientierender Vorversuche mit ^3H -Thymidin an menschlichen Urothelzellen wiesen die Versuchsergebnisse so starke Streuungen auf, daß eine differenzierte Betrachtung dieser Zellen unter Anwendung des ^3H -Thymidin-Testes wenig sinnvoll erscheint.

In den nachfolgenden Abbildungen sind die Vitalitätskurven von Brown-Pearce-Zellen den entsprechenden Kurven menschlicher Blasenkarzinomzellen gegenübergestellt. Anwendung fand als Vitalitätstest die Markierung mit ^3H -Thymidin.

Die Zellen wurden mit 0,3 bzw. 2,43 J/cm² bestrahlt, nachdem sie mit unterschiedlichen HpD-Konzentrationen photosensibilisiert worden waren.

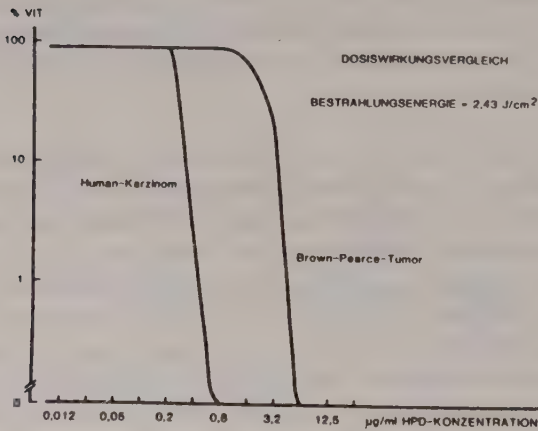
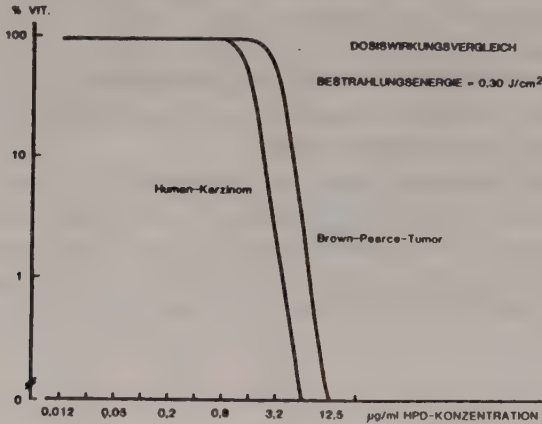


Abb. 27 + 28: Dosiswirkungsvergleich zwischen Brown-Pearce-Zellen und menschlichen Blasenkarzinomzellen; Als Vitalitätstest fand die Markierung mit ³H-Thymidin Anwendung.

Auch bei diesen beiden Bestrahlungsserien, die mit ^3H -Thymidin ausgewertet wurden, ist der Brown-Pearce-Tumor um den Faktor 2 - 8 (je nach verwendeter Bestrahlungsenergie) unempfindlicher gegenüber der Photoradiotherapie als das menschliche Blasenkarzinom. Weiterhin bestätigt dieses Experiment die Beobachtung, die im Abschnitt 6.2.5 mit Hilfe der Trypan-Blau-Färbung gemacht werden konnte, daß die Vitalitätskurven der laserbestrahlten Zellen in Abhängigkeit von der HpD-Konzentration für die Brown-Pearce-Zellen wie die Humankarzinomzellen nahezu parallel sind.

6.2.9 Vergleichende Zusammenfassung der in-vitro-Studien zur PRT; Nachweis eines "Schwarzschild"-Effektes bei der Durchführung der PRT

Im folgenden werden die Ergebnisse der durchgeführten in-vitro-Bestrahlungsexperimente noch einmal kurz verglichen; die Zusammenfassung der Ergebnisse ist nicht ganz unproblematisch, da die Versuchsbedingungen nicht in allen Einzelheiten konstant zu halten waren (unterschiedliche HpD-Chargen etc.: Siehe Diskussion Abschnitt 7.2).

Die in Abb. 15 bis 17 dargestellten Ergebnisse sind mit selbst-synthetisiertem HpD entstanden, wobei die Dosis-Wirkungskurven zu in etwa vergleichbaren Ergebnissen führen. Ab Abb. 18 findet kommerziell erhältliches HpD Verwendung. Es läßt sich eine bei vergleichbaren HpD-Konzentrationen stärkere Photosensibilisierung durch das kommerziell erhältliche HpD nachweisen.

Eine Zusammenfassung der unter Verwendung von ^3H -Thymidin durchgeführten Experimenten zur PRT von humanen Blasenkarzinomzellen zeigt nachfolgende Abbildung:

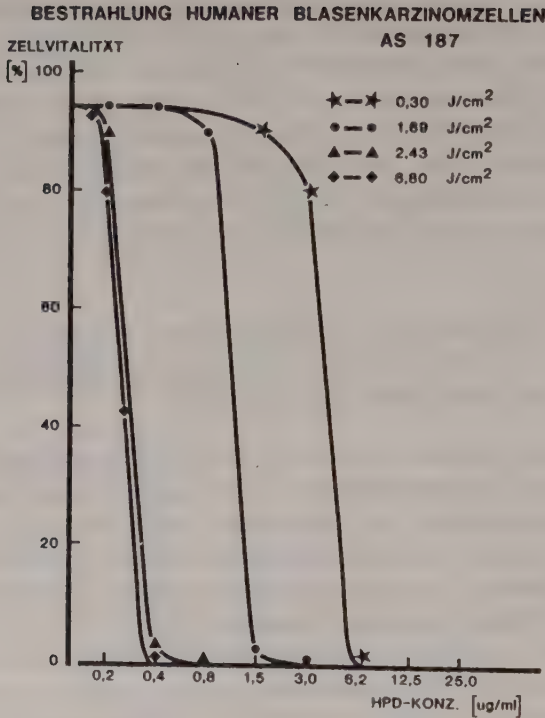


Abb. 29: In der Zusammenfassung der Bestrahlungsexperimente läßt sich zwischen den Bestrahlungsenergien von 2,43 und 6,8 J/cm² nur noch eine geringfügige Änderung der Zellzytotoxizität feststellen. Ein Schwarzschildeffekt (siehe Text) ist somit auch bei der PRT nachweisbar.

Sehr deutlich läßt sich daran zeigen, daß eine Energiesteigerung von 2,43 auf 6,8 Joule/cm² bei der verwendeten HpD-Konzentration keine große Wirkungssteigerung mehr zur Folge hat. Dieser Effekt einer Sättigung ist in der optischen Physik unter dem Begriff Schwarzschildeffekt bekannt (siehe auch nachfolgenden Abschnitt 6.2.10).

Weiterhin läßt sich bei dem direkten Vergleich der Experimente mit Trypan-Blau als Vitalitätstest feststellen, daß die PRT bei vergleichbaren HpD-Konzentrationen und Bestrahlungsenergien eine deutlich geringere Auswirkung hat (Faktor 3) als bei der Verwendung von ³H-Thymidin als Vitalitätstestung (siehe auch Diskussion Abschnitt 7.2).

6.2.10 Ergebnisse der mikroskopischen, zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung an lebenden Zellkulturen (in Zusammenarbeit mit der GSF, Neuherberg München, Dr. E. Unsöld, Dr. H. Schneckenburger)

In Kooperation mit Dr. H. Schneckenburger wurden Versuche zur zeitaufgelösten Erfassung der Fluoreszenz an lebenden Zellen vorgenommen. Wiederum fanden bei diesen Experimenten die drei bekannten Zelllinien Verwendung. In Abhängigkeit von der Zeit wurde unter Zuhilfenahme eines speziellen Mikroskops die Fluoreszenzausbeute registriert, die eine Einzelzelle nach Anregung mit einem Laserimpuls von 100 Picosekunden Dauer abgab.

Zur Erfassung der Autofluoreszenz der Zellen wurden zunächst HpD-freie Zellkulturen analysiert. Im direkten Vergleich dazu wurden Zellen vermessen, die HpD in einer Konzentration von 5 µg HpD pro Milliliter Nährlösung einen Tag lang ausgesetzt waren. Die Untersuchungsergebnisse werden aus nachfolgender Abbildung ersichtlich:

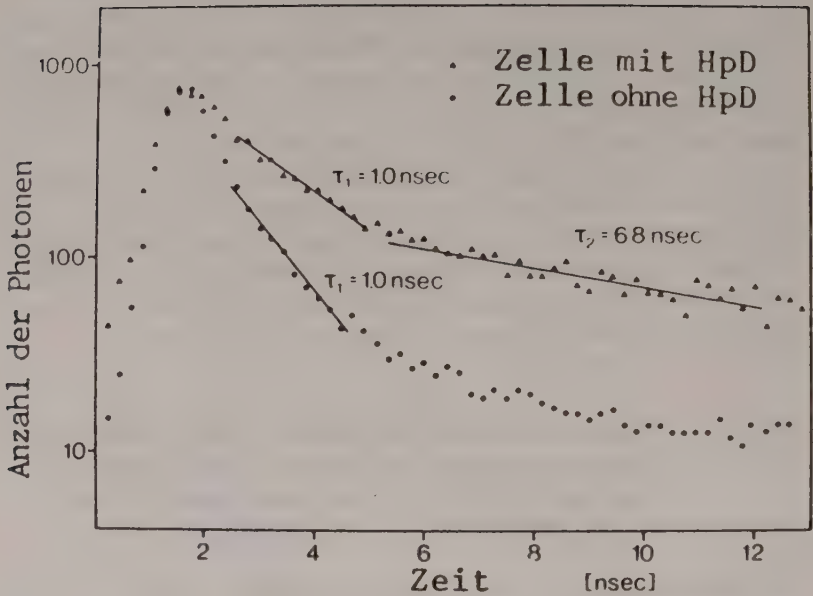


Abb. 30: Halblogarithmische Darstellung der Fluoreszenzausbeute von einzelnen Zellen, die durch einen kurzen Laserimpuls zur Fluoreszenz angeregt wurden. Vergleich zwischen HpD-freien und HpD-haltigen Zellen (aus SCHNECKENBURGER H. und Mitarbeiter: Time-Resolves-Laser-Fluorescence and Photobleaching of single cells after Photosensitization with Hematoporphyrin Derivative (HpD); Porphyrins in Tumor, herausgegeben von Alessandra ANDREONI und Rinaldo CUBEDDU, Plenum Publishing Corporation, 1984; S. 137 - 141)

Die semilogarithmische Darstellung der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung ergibt für die HpD-freien Zellen eine Fluoreszenzabklingkurve mit einer Zeitkonstanten von einer Nanosekunde. Das ist die Charakteristik der Autofluoreszenz der Zelle. Zusätzlich zu diesem schnellen Fluoreszenzabfall wird bei den HpD-inkubierten Zellen ein langsamer Anteil des Fluoreszenzabfalles deutlich, der eine Zeitkonstante von $6,5 \pm 2$ nsec aufweist. Alle drei Zelllinien zeigen dieselbe Fluoreszenzcharakteristik.

In einem weiteren Versuch wurde das Fluoreszenzverhalten des HpD nach kontinuierlicher Laserbestrahlung untersucht. Eine zeitaufgelöste Fluoreszenzkurve HpD-inkubierter Zellen wurde jeweils vor der Laserbestrahlung und im Anschluß an eine achtminütige Laserbestrahlung mit der Leistungsdichte von 300 mW/cm^2 erstellt. Das Ergebnis zeigt die nächste Abbildung:

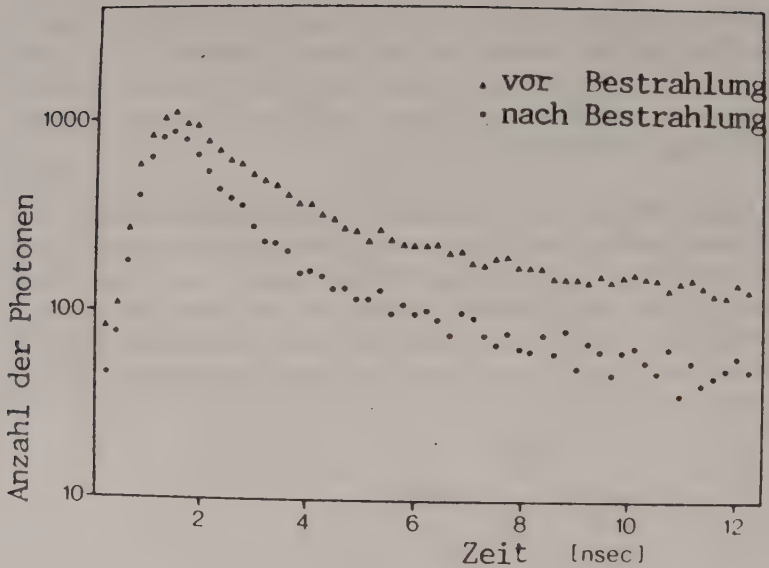


Abb. 31: Fluoreszenzabklingkurve vor (obere Kurve) und nach achtminütiger Laserbestrahlung einer HpD-haltigen Einzelzelle (aus SCHNECKENBURGER H. und Mitarbeiter: Time-Resolved-Laser-Fluorescence and Photobleaching of single cells after Photosensitization with Hematoporphyrin Derivative (HpD); Porphyrins in Tumor, herausgegeben von Alessandra ANDREONI und Rinaldo CUBEDDU, Plenum Publishing Corporation, 1984; S. 137 - 141).

Der langsame Anteil des Fluoreszenzabfalles der zeitaufgelösten Fluoreszenzkurve, der der HpD-Fluoreszenz entspricht, ist durch die kontinuierliche Laserbestrahlung um ein Vielfaches schwächer geworden. Die Autofluoreszenz jedoch behält weitestgehend die Intensität bei, die sie vor der kontinuierlichen Laserbestrahlung gezeigt hat.

Das Ausbleichverhalten, verursacht durch eine kontinuierliche Laserbestrahlung des intrazellulären HpD's, wurde durch Vermessen der Fluoreszenzausbeute in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

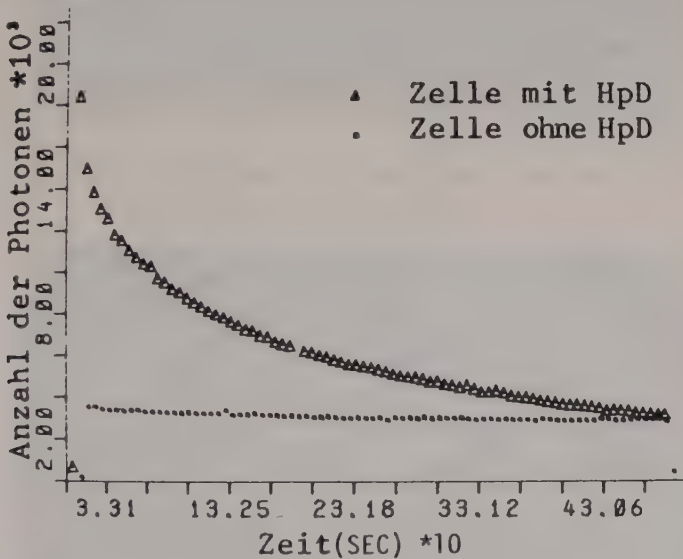


Abb. 32: Ausbleichverhalten einer Brown-Pearce-Zelle, die mit einer Lichtleistungsdichte von 300 mW/mm^2 bestrahlt wird (aus SCHNECKENBURGER H. und Mitarbeiter: Time-Resolved-Laser-Fluorescence and Photobleaching of single cells after Photosensitization with Hematoporphyrin Derivative (HpD); Porphyrins in Tumor, herausgegeben von Alessandra ANDREONI und Rinaldo CUBEDDU, Plenum Publishing Corporation, 1984; S. 137 - 141)

Aus der Abbildung geht hervor, daß die HpD-verursachte Fluoreszenz durch kontinuierliche Laserbestrahlung mit einer Energiedichte von 300 mW/mm^2 innerhalb von acht Minuten stark abfällt. Die Autofluoreszenz der Zelle hingegen bleibt nahezu unbeeinflusst. Selbst eine Energiedichte von 3 mW/mm^2 verursacht noch ein meßbares Ausbleichen des HpD. Insgesamt erklären diese Versuchsergebnisse zum Ausbleichen von HpD, daß die Anwendung hoher Laserenergien zu einer Sättigung des photoradiotherapeutischen Effektes führen kann - vermutlich infolge Zerstörung des HpD's durch die große Laserenergie (siehe auch Abschnitt 6.2.9).



Abb. 33: HpD-freie Tumorzelle unter dem Fluoreszenzmikroskop, angeregt mit UV-Licht

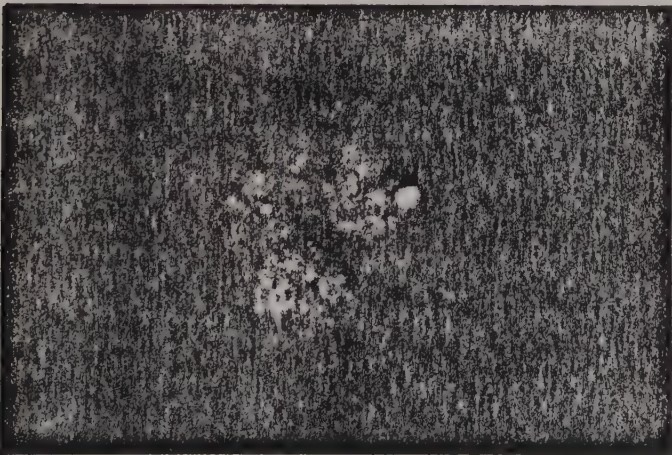


Abb. 34: Tumorzelle nach HpD-Inkubation unter dem Fluoreszenzmikroskop, angeregt mit UV-Licht
(aufgenommen in der GSF Neuherberg von Dr. H. Schneckenburger)

6.3 Das Streuverhalten von Intralipid^R: Ergebnisse

6.3.1 Meßergebnisse zur Kohärenz des an Intralipid^R gestreuten Lichtes

Bevor die Lichtstreuung durch Intralipid^R quantitativ untersucht wird, ist es notwendig nachzuweisen, daß das Licht durch die Streuung von Intralipid^R keine Wellenlängenverschiebung erfährt. Dazu wurde über den gesamten Wellenlängenbereich zwischen 220 und 800 nm das Streulicht der Fettemulsion vermessen, nachdem diese durch einen Lichtstrahl mit einer Wellenlänge von 625 nm angeregt wurde.

In der nachfolgenden Abbildung ist das Streulichtspektrum dargestellt, das im rechten Winkel zur Anregungslichtquelle vermessen wurde:

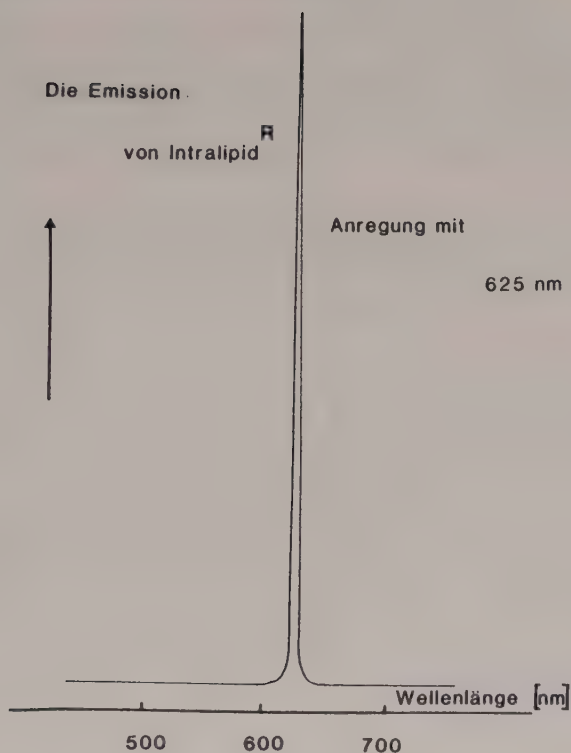


Abb. 35: Das Streulichtspektrum von Intralipid ^R unter einer Lichtanregung mit einer Wellenlänge von 625 nm.

Es ergibt sich eine absolut symmetrische Emissionskurve mit einem Maximum bei 625 nm. Aus diesem Versuchsergebnis ist ersichtlich, daß die Lichtstreuung an Intralipid ^R von keiner Wellenlängenverschiebung begleitet ist. Damit ist eine wichtige Voraussetzung für die Verwendung von Intralipid ^R als Streumedium erfüllt.

6.3.2 Die Wellenlängenabhängigkeit der Lichtstreuung durch Intralipid^R

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Intensität der Lichtstreuung durch Intralipid^R in Abhängigkeit von der Wellenlänge:



Abb. 36: Die Intensität der Lichtstreuung durch Intralipid^R in Abhängigkeit von der Wellenlänge.

Aus dieser Kurve werden mehrere Tatsachen ersichtlich:

1. Im Bereich zwischen 220 und 300 nm ist die Absorption durch die Fettemulsion so groß, daß eine Lichtstreuung im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht nachweisbar ist.
2. Im Bereich zwischen 300 und 540 nm läßt sich eine zunehmende Streuintensität beobachten, da die Lichtabsorption durch Intralipid^R in diesem Wellenlängenbereich stetig abnimmt.
3. Im Bereich zwischen 540 und 750 nm nimmt die Kurve einen paraboloiden Verlauf an. Wie sich jedoch aus genauerer mathematischer Analyse dieses Kurvenabschnittes ergibt, entspricht dieser Kurvenverlauf nicht den von RAYLEIGH postulierten Streugesetzen, wonach die Lichtstreuung mit der 4. Potenz der Lichtfrequenz zunimmt. Daraus ist zu folgern, daß auch in diesem Kurventeil zwischen 540 und 750 nm die Lichtstreuung von einer Lichtabsorption überlagert wird, was in gutem Einklang mit den nachfolgend beschriebenen Ergebnissen steht.

6.3.3 Die optischen Eigenschaften eines plangeschnittenen sowie eines zu einer Spitze ausgezogenen Lichtleiterendes

Mit Hilfe einer Photodiode, die im Abstand von 30 cm in einem Kreis um das Lichtleiterende geführt wurde, konnte die Ausgangscharakteristik eines plangeschnittenen Lichtleiterendes vermessen werden. In Abhängigkeit der Polarkoordinaten wurde die Lichtleistung mit einem Schreiber registriert. Die 180°-Stellung entspricht dabei der Lichtleistung in Verlängerung des Lichtleiters, 0° der retrograden Streuung. Die nachfolgende Abbildung zeigt das Ergebnis:

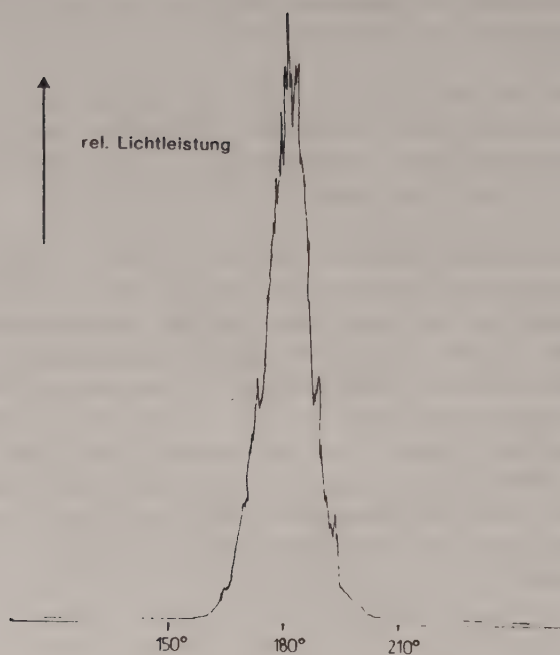


Abb. 37: Die Lichtleistung eines plangeschnittenen Lichtleiters wird mit einer Photodiode gemessen, die in einer horizontalen Kreisbahn um die Lichtleiter-
spitze geführt wird.

Die Bestrahlungsexperimente an den Zellkulturen wurden mit einem Lichtleiter dieser Art durchgeführt. Anhand der vermessenen Ausgangscharakteristik des plangeschnittenen Lichtleiters können für die Zellkulturversuche zwei wesentliche Erkenntnisse gewonnen werden:

1. Für die Zellkulturversuche wurde das Laserlicht in einem Bereich genutzt, der bei vorstehender Lichtmessung dem Winkelbereich von 175° bis 185° entspricht. Aus der Kurve kann entnommen werden, daß die Randbereiche der Zellkulturplatten nur mit etwa 70 % der Leistungsdichte bestrahlt wurden, die im Zentrum vorhanden war.
2. Das Flächenintegral unter der Kurve kann der Gesamtlichtleistung gleichgesetzt werden, die mit einem Powermeter gemessen werden kann. Bei den Zellkulturversuchen wurde zur Angabe der Lichtleistungsdichte eine Messung mit einem Powermeter herangezogen. Die effektiv wirksame Lichtleistung entspricht jedoch in etwa dem Flächenintegral unter der Kurve zwischen 175° und 185° . Die Zellkulturversuche wurden daher mit wirksamen Bestrahlungsenergien vollzogen, die in etwa 30 - 40 % niedriger lagen als die mit Hilfe des Powermeters ermittelten Werte.

In einem weiteren Versuch wurde die Ausgangscharakteristik des unter hoher Temperatur zu einer Spitze ausgezogenen Lichtleiterendes vermessen. Das Ergebnis geht aus der nachfolgenden Abbildung hervor:

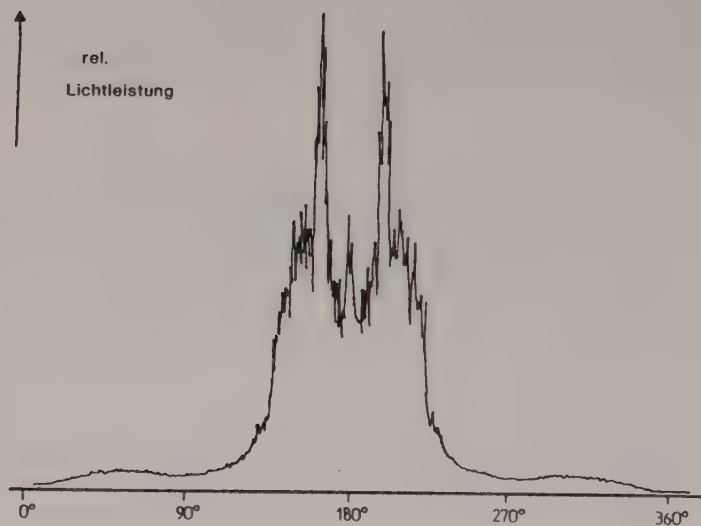


Abb. 38: Die Ausgangscharakteristik eines zu einer Spitze ausgezogenen Lichtleiterendes

Die Abbildung verdeutlicht, daß der Lichtaustrittswinkel wesentlich größer ist, als bei der Verwendung des plangeschnittenen Lichtleiterendes. Die maximale Lichtleistung wird nicht genau in der Verlängerung des Lichtleiters registriert, sondern etwas seitlich davon. Die Projektion des Laserlichtes durch eine ausgezogene Lichtleiterspitze ergibt also konzentrische Kreise.

6.3.4 Das Lichtstreuverhalten an Intralipid^R im Glasmodell

In den folgenden Experimenten wurde unter Verwendung einer Glaskugel mit 320 ml Fassungsvermögen die Streuung von Licht an verschiedenen Verdünnungen von Intralipid^R mit Wasser untersucht. Die Lichtleistung wurde dabei wiederum in Abhängigkeit von den Polarkoordinaten registriert, wobei 180° der Lichtleistung in Verlängerung des Lichtleiters entsprach und 0° die exakt nach rückwärts abgegebene Lichtleistung zeigt. Die nachfolgende Abbildung stellt eine repräsentative Zusammenfassung der Versuchsergebnisse dar.

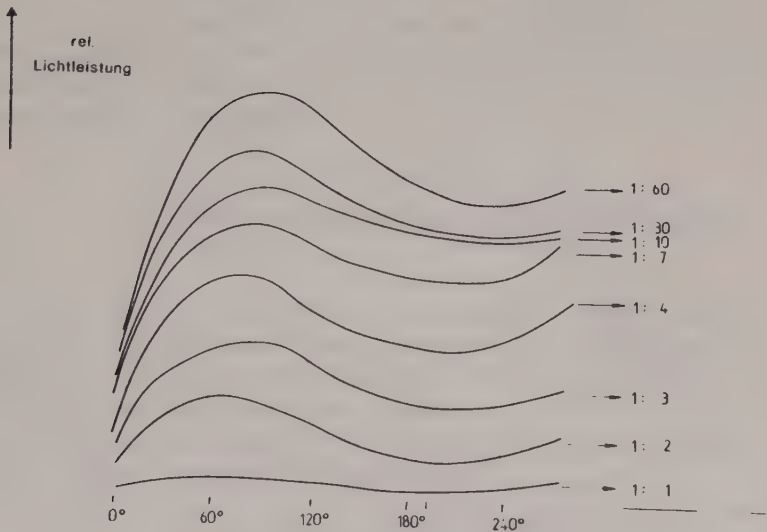


Abb. 39: Das Streuverhalten von verschiedenen Verdünnungen von Intralipid mit Kochsalzlösung

In der Abbildung sind Verdünnungen von 1 : 1 bis 1 : 60 (= Fettemulsion zu Wasser) in ihrer Streucharakteristik erfaßt. Eine nahezu homogene Lichtverteilung wird mit der niedrigen Verdünnung von 1 : 1 erzielt. Wiederum ist das Flächenintegral unter der Kurve zur groben Abschätzung der freiwerdenden Lichtleistung geeignet. Die Verdünnung 1 : 1 absorbiert etwa 95 % der Lichtenergie, so daß sie für die therapeutische Verwendung nicht praktikabel ist.

Je weiter die Fettemulsion verdünnt wird, desto weniger Lichtenergie wird von der Emulsion absorbiert. Dies wird zum Anlaß genommen, starke Emulsionsverdünnungen zu analysieren. Die nachfolgende Kurve zeigt drei repräsentative Kurven von 10 Messungen an stark verdünnten Fettemulsionen:

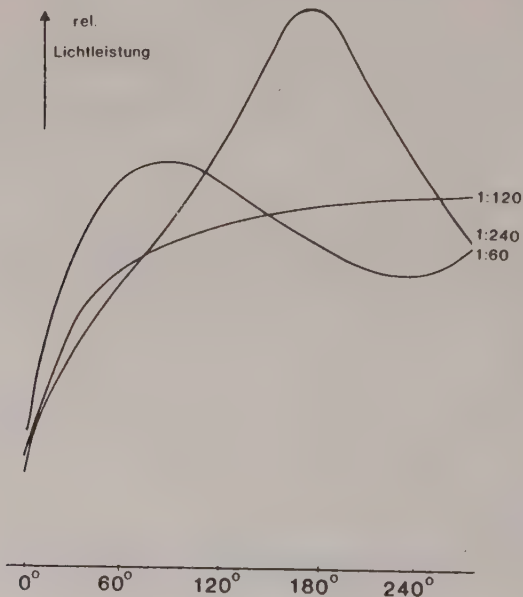


Abb. 40: Das Streuverhalten von hohen Verdünnungen von Intralipid^R

Es wird deutlich, daß ab einer Verdünnung von 1 : 120 eine starke Vorwärtsstrahlung eintritt. Höhere Verdünnungen des Streumediums zur therapeutischen Anwendung erscheinen nicht mehr sinnvoll.

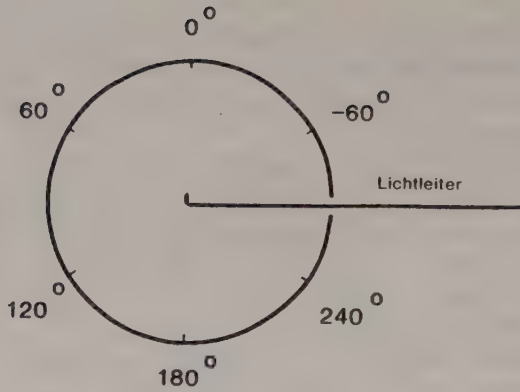
Mit Hilfe der Flächenintegrale unter den Kurven wird eine grobe Abschätzung der Absorptionsverhältnisse der Fette­mul­sion vorgenommen. Die Verdünnung der Fette­mul­sion mit Wasser im Verhältnis 1 : 60 erscheint therapeutisch nutzbar. Der Vergleich der Flächenintegrale der Lichtstreu­kurven der Lichtleiterspitze allein bzw. mit der 1 : 60 verdünnten Fette­mul­sion ergibt, daß bei dieser Verdünnung ca. 30 % der Lichtleistung von der Emulsion absorbiert werden.

Vergleichende Experimente, durchgeführt an einem Glaskolben mit einem Fassungsvermögen von 150 ml, ergaben bei einer Verdünnung der Fette­mul­sion auf 1 : 10 größtmögliche Lichtstreuung bei einer tolerierbaren Lichtabsorption von etwa 30 %. Das Volumen des verwendeten Streumediums spielt demnach eine wichtige Rolle bei der Abschätzung der idealen Verdünnung der Fette­mul­sion.

6.3.5 Die Lichtstreuung, vermessen an einem abgewinkelten Lichtleiter

Für die weiteren Experimente wurden zwei Veränderungen am Glasmodell vorgenommen. Verwendung fand ein um 90° abgewinkelter Lichtleiter. Außerdem wurde die Lichtleistung nun direkt an der Glasoberfläche gemessen.

Zur Veranschaulichung der Winkelverhältnisse soll nachfolgende schematische Darstellung dienen.



schematische Darstellung der Polarkoordinaten

Abb. 41: Schematische Darstellung der Winkelverhältnisse bei der Messung mit gewinkeltem Lichtleiter.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Ausgangscharakteristik eines abgewinkelten Lichtleiters:

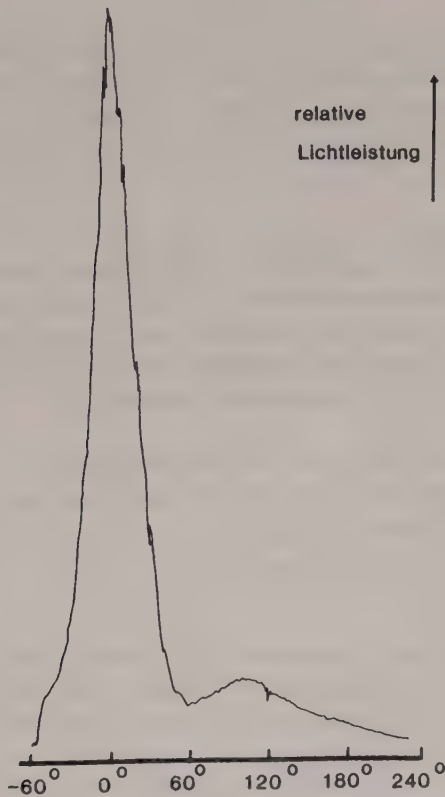


Abb. 42: Die Ausgangscharakteristik des gewinkelten Lichtleiters, gemessen mit einer Photodiode, die in einem horizontalen Kreis um die Lichtleiterspitze geführt wurde.

Der Lichtleiter hat gegenüber dem zu einer Spitze ausgezogenen Lichtleiter seine Ausgangscharakteristik in zweierlei Hinsicht verändert:

1. Ist der Lichtkegel des gewinkelten Lichtleiters etwas schmaler als der Lichtkegel des spitzen Lichtleiters, und
2. ist in Verlängerung des langen Lichtleiterschenkels ein weiterer breitbasiger Peak zu finden. Dieser prograde Lichtaustritt aus der Abwinkelungsstelle des Lichtleiters repräsentiert nur etwa 10 % der gesamten Lichtleistung.

Der abgewinkelte Lichtleiter kann also in guter Näherung eine Messung zur Vorwärts- wie zur Rückwärts-Streuung ermöglichen. Die Photodiode läßt sich bei dieser modifizierten Versuchsanordnung, im Gegensatz zum vorhergehenden Experiment nun auch exakt entgegengesetzt der vom Lichtleiterende emittierten Lichtstrahlung positionieren.

Es wurden 10 Messungen mit Verdünnungen von 1 : 20 bis 1 : 320 durchgeführt. Die nächste Abbildung zeigt die repräsentativen Kurvenverläufe:

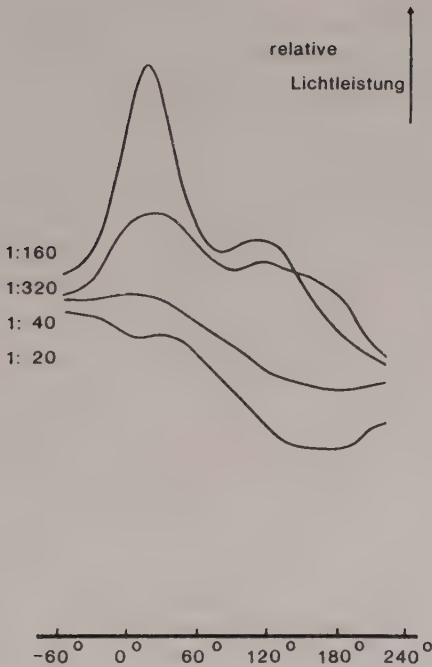


Abb. 43: Die Lichtstreuung von unterschiedlichen Verdünnungen von Intralipid^R mit Wasser, gemessen mit einer abgewinkelten Lichtleiterspitze

Aus der Abbildung geht hervor, daß die Leistungsdichte des retrograd gestreuten Lichtes, gemessen bei 180° deutlich geringer ist, als die Leistungsdichte der Vorwärtsstreuung. Durch Anwendung mittlerer Verdünnungen läßt sich der Unterschied zwischen Vorwärts- und Rückwärtsstreuung minimalisieren. Dies geht aus der nachfolgenden Originalregistrierung hervor, die mit einer Verdünnung von 1 : 80 entstanden ist.

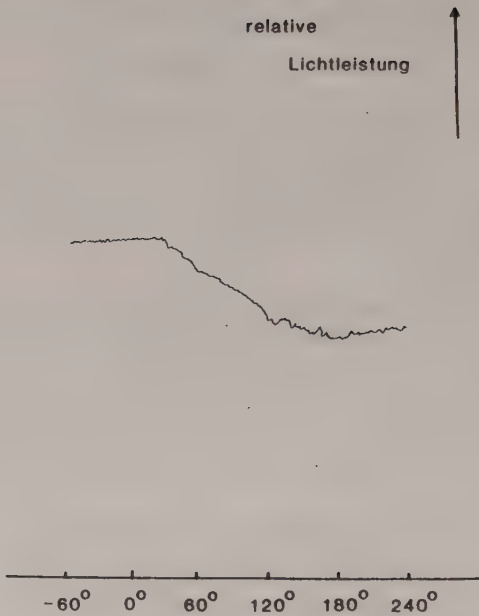


Abb. 44: Die Lichtstreuung an Intralipid ^R, das mit 80 Teilen Wasser verdünnt wurde, gemessen an einem gewinkelten Lichtleiterende.

Die Rückwärtsstreuung liegt nur etwa um 20 % niedriger, als die Vorwärtsstreuung. Dies kommt dem Ziel einer therapeutischen Laserausleuchtung des gesamten Hohlorgans mit homogener Energiedichtenverteilung schon recht nahe.

Mit Hilfe einer kleinen Zusatzmaßnahme läßt sich die Leistungsdifferenz zwischen Vorwärts- und Rückwärtsstreuung noch weitergehend unterdrücken.

Wird das Lichtleiterende nicht in den Mittelpunkt der Blase zentriert, sondern etwas nach rückwärts verlagert, so verringert sich entsprechend dem größeren Abstand zur Blasen-vorderwand dort die Lichtleistungsdichte, während die Leistungsdichte an der Blasenrückwand zunimmt. Durch Dezentrieren des Lichtleiterendes läßt sich die oben beobachtete Leistungsdifferenz zwischen prograder und retrograder Streuung vollständig aufheben, wie die Originalregistrierung nachfolgender Messung zeigt:



Abb. 45: Die Lichtstreuung an 1 : 80 verdünntem Intralipid^R, optimiert durch Dezentrierung der Lichtleiterspitze

Das Ziel einer homogenen Lichtstreuung läßt sich somit durch Intralipid^R weitestgehend erreichen. Die dabei resultierende Lichtabsorption von etwa 30 % ist angesichts der hohen Ausgangsleistung moderner Farbstofflaser kompensierbar.

7 Diskussion

7.1 HpD-Konzentrationsbestimmung im Tumor und im
 gesunden Gewebe

Bevor eine objektive Beurteilung der Ergebnisse möglich ist, muß noch einmal in Kürze auf die Problematik einer fluorometrischen Konzentrationbestimmung des HpD eingegangen werden.

Der fluorometrische HpD-Nachweis ist eine Methode, die direkt Auskunft über das Vorhandensein nichtverstoffwechselten HpD gibt. Die meisten Daten über die Pharmakokinetik des HpD, die der Literatur zu entnehmen sind, entstammen Experimenten mit ^3H - oder ^{14}C -Isotopenmarkierung des HpD. Es ist bekannt, daß im Rahmen des biochemischen Stoffwechsels innerhalb des Organismus die Wasserstoffatome einen starken Austausch durchlaufen. Insbesondere die Daten, die durch Verwendung von Tritium ermittelt sind, sind deshalb sehr vorsichtig zu beurteilen. Jedoch auch die Anwendung von ^{14}C schützt nicht vor dem fälschlichen Nachweis von Porphyrinstoffwechselprodukten. Dennoch sind die Isotopennachweise in ihrem Wert, was die Aufklärung der pharmakokinetischen Erkenntnisse über das HpD betrifft, unumstritten.

Gerade aber beim Nachweis des HpD in Geweben der Harnblase erscheinen die Isotope in ihrer Anwendung besonders problematisch.

Zum porphyrinabbauenden Stoffwechsel ist bekannt, daß die Porphyrine zu ihrer Ausscheidung aus dem Organismus in der Leber in ihrer Ringstruktur aufgebrochen werden. Als offenkettige Tetrapyrrole werden diese Porphyrinabbauprodukte teilweise über die Faeces ausgeschieden, zu ca. 10 - 30 % im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufs jedoch dem Blutplasma und somit der Niere zugeführt. Im Urin erscheinen demzufolge Porphyrine und Porphyrinabbauprodukte. Eine systemische Gabe isotope-markierter Porphyrine hätte nach einer gewissen Zeit eine Isotopenanreicherung des Urins zur

Folge. Die Bestimmung nichtverstoffwechselter isotoopenmarkierter Porphyrine im Harnblasengewebe würde durch die Überlagerung der isotoopenmarkierten Porphyrinabbauprodukte verzerrt werden. Der fluorometrische Nachweis hingegen erfaßt ausschließlich Tetrapyrrole mit erhaltener Ringstruktur, also die Moleküle, die zur Anwendung einer Photoradiotherapie an der Harnblase relevant sind. Dieser Vorteil wird jedoch mit einem Nachteil erkaufte. Die Nachweisempfindlichkeit der Methode ist wesentlich geringer als die der Isotopenmethode. Die fluorometrische Nachweismethode mißt alle Porphyrine einschließlich der aus dem Hämoglobin des Blutes freiwerdenden. So ergibt sich eine "Untergrund-Fluoreszenz", die von der Durchblutung des untersuchten Gewebes abhängig ist. Die fluorometrische Methode erfaßt deshalb auch die Mehrdurchblutung des Tumors gegenüber gesundem Gewebe, was die folgenden Zahlen leicht veranschaulichen können. HpD-freie Kaninchen-Tumoren haben im Mittel 1,255 µg Porphyrine pro Gramm Gewebe, wohingegen tumorfrees Gewebe nur 1,002 µg aufweist. Analog ergibt die Tumoranalyse der Ratte 1,55 µg/g im Vergleich zum gesunden Gewebe mit 1,12 µg/g.

Eine differenzierte Betrachtung des HpD-Konzentrationsverlaufs ist deshalb gerade beim gesunden Harnblasengewebe mit seinen niedrigen HpD-Spiegeln mit der fluorometrischen Methode nicht möglich. Letztendlich kann deshalb nicht sicher angegeben werden, ab wann tumorfrees Gewebe von HpD vollständig geklärt ist. Deutlich läßt sich jedoch fluorometrisch das Maximum des HpD-Gradienten zwischen Tumor und gesundem Gewebe zeigen. Das Maximum an HpD im Tumor ist sowohl beim induzierten Rattentumor als auch beim transplantierten Kaninentumor sechs Stunden nach systemischer HpD-Gabe zu finden. In der daran anschließenden Zeit weisen beide Tumorarten eine vergleichbar langsame HpD-Ausschleusung auf. Bei der Ratte nach sechs Stunden, beim Kaninchen nach zwölf Stunden läßt sich im gesunden Harnblasengewebe kein HpD mehr finden. Ob die Rattenblase gegenüber der

Kaninchenblase tatsächlich eine schnellere HpD-Clearance besitzt, kann bei der Genauigkeit der fluorometrischen Nachweismethode allerdings nur mit Vorsicht angenommen werden. Eindeutig läßt sich jedoch ein hoher Konzentrationsgradient zwischen Tumor und gesunder Harnblase sowohl beim transplantierten Brown-Pearce-Tumor als auch beim chemisch induzierten Rattenblasentumor über Tage hinweg aufzeigen. Von besonderem Interesse ist, daß 28 % der Brown-Pearce-Tumoren, also rund ein Drittel, keine Anreicherung des HpD zeigen. Dieses Ergebnis erklärt sich aus der außerordentlich unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren. Sehr schnell wachsende, stark nekrotisierende Tumoren scheinen sich den HpD-Anreicherungsmechanismen eher zu entziehen. Dies verwundert nicht, da nach BUGELSKY (7) die Plasmahalbwertszeit für systemisch verabreichtes HpD nur wenige Stunden beträgt. Es ist zu vermuten, daß Tumormassen, die nach der Klärung des Plasmas von HpD gewachsen sind, kein HpD mehr einlagern konnten.

Die unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit transplantierter Tumoren erklärt auch die größeren Streuungen in den Ergebnissen der Kaninchen-Experimente gegenüber denen der Rattenexperimente. Trotz der Streuung läßt sich eindeutig zeigen, daß auch ein transplanterter Tumor die Fähigkeit zur selektiven HpD-Einlagerung besitzt.

Weiterhin können mit den Ergebnissen Richtlinien über notwendige HpD-Einwirkungszeiten gegeben werden für weiterführende Tierversuche.

Die für das Tumorgewebe aufgezeigten HpD-Konzentrationen finden Anwendung bei der Bestrahlung von Zellkulturen.

7.2 Diskussion der in-vitro Bestrahlungsergebnisse an Zellkulturen

Die in-vitro Experimente an Zellkulturen wurden im Hinblick auf mehrere Fragestellungen zur Photoradiotherapie durchgeführt:

1. Welche HpD-Konzentrationen sind erforderlich zur ausreichenden Photosensibilisierung von Zellen?
2. Welche Bestrahlungsdosen sind erforderlich zur vollständigen Abtötung photosensibilisierter Zellen? Insbesondere die Verwendung von Rotlicht, das einerseits aufgrund seiner großen Gewebseindringtiefe (47) für die Tumorthherapie Vorteile bringt, andererseits jedoch nicht im Absorptionsmaximum von HpD liegt, sollte auf die Wirksamkeit hin geprüft werden.
3. Wirkt HpD alleine, ohne Anwendung von Licht, bereits zytotoxisch?
4. Wirkt Rotlicht alleine - ohne HpD - in für die Therapie erforderlichen Energiebereichen zytotoxisch?
5. Verhalten sich entartete Zellen im in-vitro Experiment anders als gesunde Zellen? Ergeben sich daraus Rückschlüsse auf die Mechanismen der Photoradiotherapie?

Generell ist bei der Planung der Zellkulturversuche die Überlegung erforderlich, inwieweit Rückschlüsse von diesen Experimenten auf in-vivo Verhältnisse gezogen werden dürfen. Von besonderem Interesse für die Anwendung der Photoradiotherapie sind Dosis-Wirkungsbeziehungen. Aus den Zellkulturversuchen wird ersichtlich, daß HpD-Konzentrationen zwischen 1 und 10 µg/ml im Extrazellulärraum die Zellen ausreichend gegenüber Licht photosensibilisieren. Diese

Konzentrationen sind in-vivo nach systemischer HpD-Gabe im Tumorgewebe zu erreichen, so daß eine selektive Therapie des Tumors möglich sein müßte. Schwieriger gestalten sich die Aussagen zur erforderlichen Energiedichte des therapeutischen Lichtes. Die Zellen wachsen vorwiegend in einer Schicht und werden deshalb bei der Bestrahlung alle von einer etwa gleich starken Lichtleistung getroffen.

Im Gewebe herrschen andere Bedingungen. Hier wird die oberste Zellschicht einer hohen Energiedichte ausgesetzt, wohingegen tiefere Zellschichten nur noch von Bruchteilen der Lichtenergie erreicht werden.

Anhand von Zellkulturen läßt sich aufzeigen, daß eine Bestrahlungsdosis von 100 Joule/cm^2 nicht photosensibilisierte Zellen nur zu 7 % abtötet. Es genügen jedoch 20 Joule/cm^2 , um Zellen völlig abzutöten, die mit $5 \mu\text{g}$ HpD pro Milliliter Nährmedium photosensibilisiert sind. Berücksichtigt werden muß bei dieser Energiebetrachtung, daß die mit dem Powermeter ermittelten, hier zugrundegelegten Lichtleistungen Zellen nur zu etwa 50 % tatsächlich zu treffen (siehe Abschnitt 6.3.3).

Könnte man die in-vitro-Ergebnisse der Zellkulturversuche uneingeschränkt auf in-vivo Verhältnisse übertragen, hieße das, daß eine Bestrahlung mit einer Lichtenergie von 50 J/cm^2 nichtphotosensibilisiertes gesundes Blasenurothel nur wenig schädigen würde, wohingegen photosensibilisierte Tumorzellen bis in Gewebstiefen hinein zerstört würden, die noch mindestens einer Energiedichte von 10 J/cm^2 ausgesetzt wären.

In Verbindung mit einer Arbeit von PETERSON (47) läßt sich mit diesen Energieangaben auch in etwa die Eindringtiefe der PRT abschätzen. Nach PETERSON durchdringen etwa 60 % des Lichtes mit einer Wellenlänge von 630 nm eine 1,6 mm dicke Blasenwand. Die Lichtleistung in Abhängigkeit zur Schichtdicke genügt nachfolgender Exponentialfunktion:

$$L = L_0 \cdot e^{-\frac{d}{d_0}}$$

mit d_0 = Schichtdicke, die $1/e$ an Licht durchläßt,
 L_0 = Lichtleistung an der Geweboberfläche,
 und d = Schichtdicke.

Aus den Daten von PETERSON folgt:

$$d_0 = \frac{1,6}{\ln \frac{3}{5}}$$

Aus den eigenen Daten folgt, daß $1/5$ der Lichtleistung, die die Blasenoberfläche erreicht, gerade ausreicht, um photosensibilisierte Tumorzellen zu devitalisieren. Nach obiger Formel folgt hieraus:

$$\frac{1}{5} = e^{-\frac{d}{d_0}} \text{ daraus folgt } d = -d_0 \ln \frac{1}{5} = \frac{1,6}{\ln \frac{3}{5}} \ln \frac{1}{5} = \text{Ca. } 5 \text{ mm}$$

Die PRT ist also unter der Annahme, daß ein Lichtleistungsgradient von 1 : 5 zwischen Geweboberfläche und Gewebstiefe möglich ist, in einer Gewebstiefe von 5 mm noch ausreichend wirksam. Diese theoretische Betrachtung deckt sich mit den von SVAASAND und DOIRON gefundenen Ergebnissen (55). Der Rückschluß von Zellkulturversuchen auf in-vivo-Verhältnisse ist sicherlich problematisch. Anzunehmen ist, daß Zellkulturen empfindlicher reagieren, als Tumorgewebe in-vivo. Andererseits konnte mit Hilfe der Zellkulturen aber auch gezeigt werden, daß der Zellkontakt (siehe Abschnitt 6.2.1) den Grad der Photosensibilisierung steigern kann, was unter Umständen beim Tumor in-vivo eine große Rolle spielt.

Es ist sicherlich nicht sinnvoll, die Lichtenergien, die zum Abtöten von photosensibilisierten Zellkulturen erforderlich sind, in ihren Absolutwerten auf in-vivo Verhältnisse zu übertragen. Bezüglich der therapeutischen Breite einer Laserlichtbestrahlung dürften jedoch in etwa die Ergebnisse der Zellkulturversuche auf Tumorgewebe in-vivo übertragbar

sein. Die vorstehende Berechnung der Eindringtiefe der PRT erscheint unter Berücksichtigung des durch die therapeutische Breite vorgegebenen Lichtgradienten von 1 : 5 zulässig. Hp allein, ohne Anwendung von Licht, wirkt bei den Zellkulturversuchen bis zu einer Konzentration von 500 µg HpD/ml nicht toxisch. Dies konnte in den Experimenten mit Trypan-Blau eindeutig gezeigt werden. Dasselbe Experiment mit der Anwendung von ³H-Thymidin zeigt jedoch eine deutliche Reaktion der Zellen ab 20 µg HpD/ml. Dies kann zwei Gründe haben:

1. Die Durchführung der Markierung der Zellkulturen mit ³H-Thymidin erfordert eine gewisse Lichtexposition der Zellen.
2. Die Experimente unter Verwendung von ³H-Thymidin zur Vitalitätstestung ergeben eine wesentlich höhere zytotoxische Auswirkung der PRT auf die Zellen, als die Experimente unter Verwendung von Trypan-Blau (Gründe siehe weiter unten).

Deshalb kann aus den Versuchsergebnissen nicht gefolgert werden, daß HpD alleine, ohne Anwendung von Licht, in Konzentrationsbereichen von weniger als 500 µg/ml zytotoxisch wirkt.

Es bleibt festzustellen, daß weder Licht allein, bis zu einer Energiedichte von 100 J/cm², noch HpD in einer Konzentration bis 500 µg/ml ohne Licht eine nennenswerte Zellschädigung verursacht.

Die an den drei Zellarten erarbeiteten Dosis-Wirkungskurven zeigen im wesentlichen vergleichbare Verläufe. Die empfindlicheren Zellen humanen Ursprungs reagieren bei niedrigeren HpD-Konzentrationen bzw. Bestrahlungsenergien sowie mit steilerem Kurvenverlauf. Bei einigen Kurven tritt im Verlauf

der Vitalitätskurve eine Schulter auf. Diese Schulter findet eine einfache Erklärung. Oberhalb der Schulter ist die Zelle aufgrund der nur schwachen Schädigung noch in der Lage, gewisse Reparaturmechanismen zu entwickeln. Diese Reparaturmechanismen scheinen ab einer gewissen Intensität der PRT zerstört zu werden, was einen steileren Kurvenabfall unterhalb dieses kritischen Punktes zur Folge hat.

Der schulterförmige Kurvenverlauf ist deshalb auch nur bei Dosis-Wirkungskurven zu beobachten, die mit niedrigen HpD-Konzentrationen erstellt worden sind.

Die Kurvenbereiche mittlerer Zellvitalität zeigen bei der Reproduktion der Experimente größere Streubreiten. Diese Streuungen finden mehrere Erklärungen:

1. Die Zellen weisen entsprechend den Anzuchtbedingungen, die sich nicht absolut konstant halten lassen, eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber allen zellschädigenden Maßnahmen auf,
2. die Zusammensetzung der verwendeten HpD-Chargen ist unterschiedlich. Vor allem die Konzentration an hydrophilen Porphyrinderivaten ist von Charge zu Charge sehr verschieden. Dies führt zu einer unterschiedlichen HpD-Aufnahme in die Zelle und damit zu einer unterschiedlich intensiven Photosensibilisierung der Zelle gegenüber Licht,
3. beim Zelltransport von den Brutschränken zu den Bestrahlungsräumen sind zellschädigende Temperaturschwankungen unterschiedlichen Ausmaßes unvermeidbar und
4. die homogene Lichtverteilung ist im Rahmen der Zellkulturbestrahlungen nur sehr schwer realisierbar. Die Ankopplung des Lichtleiters an den Farbstoff-Laser verursacht am Lichtleiterende einen Projektionskegel

von jeweils unterschiedlicher geometrischer Charakteristik. Die bedeutungsvollere Ursache einer inhomogenen Lichtverteilung auf die Zellsuspension lag in den optischen Eigenschaften der Zellbehältergründe begründet, die für die Bestrahlungsversuche Verwendung finden mußte.

Die Durchlässigkeit des Plastikmaterials für Rotlicht ist eingehend untersucht und bereitet keine Probleme. Bestrahlungsunregelmäßigkeiten treten jedoch auf als Folge verschiedener Reflexionen an den Plastikwänden und Kulturplatten. Zwei Punkte verdienen besondere Aufmerksamkeit:

1. Die Seitenwände, die die Einzelfelder voneinander trennen, stehen senkrecht auf der Unterlage. Das Ende des bestrahlenden Lichtleiters ist als punktförmige Lichtquelle aufzufassen, die das Licht in divergierendem Strahlenverlauf auf die Zellkulturplatten projiziert. Es folgt daraus, daß die Seitenwände der Kulturplatten, die nicht alle parallel zu den projizierten Lichtstrahlen stehen, Schatten auf die Zellen werfen können. Deshalb sind zur Minimalisierung dieser Fehlerquelle die Randbezirke der einzelnen Felder zur Auswertung nicht herangezogen worden.
2. Die Einzelfelder der Mikrotiterplatten besitzen einen halbkugelförmigen Boden. Dieser Boden kann näherungsweise als Rotationsparaboloid aufgefaßt werden. Daraus resultiert eine Fokussierung des reflektierten Lichtes auf einen Punkt innerhalb der Zellsuspension. Die einzelnen Felder sind sehr unterschiedlich, so daß nicht mit einem konstanten Fehler gerechnet werden kann.

Die beiden exemplarisch dargestellten Fehlerquellen sind innerhalb einer Vielzahl schwer erfaßbarer optischer Unregelmäßigkeiten der Zellbestrahlung zu sehen.

Eine Streuung der Versuchsergebnisse läßt sich somit bei den in-vitro Bestrahlungsexperimenten nicht vermeiden. Erst eine Vielzahl von Experimenten ermöglicht über das statistische Mittel eine gültige Aussage. Die Verwendung von 100 Lab-Tek-Platten mit insgesamt 800 Einzelfeldern bzw. von 10 verwertbaren ^3H -Thymidin-Platten mit insgesamt 900 Einzelfeldern läßt klare Aussagen zu. Weiterhin ist zu erwarten, daß eine noch größere Anzahl von Ergebnissen aufgrund der biologischen Streubreite der Versuche keine differenzierteren Erkenntnisse mehr erbringen dürfte.

Inwieweit sich eine klinisch relevante Konsequenz aus den Ergebnissen der Bestrahlungsexperimente ergibt, in denen die Laser-Bestrahlung fraktioniert verabreicht wurde, kann erst der klinische Alltag zeigen. Die Einsparung von Bestrahlungsenergie durch die Fraktionierung der Bestrahlung ist so groß, daß besondere Mechanismen diskutiert werden müssen. Anzunehmen ist, daß die Erstbestrahlung von Zellen dazu führt, daß die HpD-Aufnahme in die Zelle gesteigert wird, so daß der Photosensibilisierungsgrad der Zelle bei allen weiteren Bestrahlungen wesentlich höher ist. Weiterführende Experimente zur Bestätigung dieser These wären erforderlich.

Nachfolgend soll versucht werden, durch Analyse der zellvergleichenden Untersuchungen die Mechanismen der PRT zu erhehlen. Dazu sind einige theoretische Überlegungen erforderlich:

Der Vitalitätstest mit Hilfe von Trypan-Blau gestattet gegenüber der Verwendung von ^3H -Thymidin eine wesentlich differenziertere Betrachtung mittlerer Vitalitätsbereiche. Um geringfügige Unterschiede zwischen den einzelnen Zellkulturen aufzeigen zu können, empfiehlt sich die Verwendung von Trypan-Blau. Allerdings läßt die Trypan-Blau-Färbung bei den menschlichen Blasenkarzinomzellen aufgrund deren dreidimensionaler Wachstumsweise nur eine schlechte Beurteilung dieser Zelllinie zu. Der ^3H -Thymidin-Nachweis zur Einschätzung der Vitalität eignet sich hervorragend bei Zellen mit

hoher DNS-Synthese-Rate, also bei den sich schnell vermehrenden Zellen. Gerade das menschliche Blasenkarzinom läßt sich ausgezeichnet mit diesem Test erfassen. Aufgrund der geringen Wachstumsgeschwindigkeit der menschlichen gesunden Urothelzellen ist der ^3H -Thymidin-Test bei diesen Zellen zur Erzielung einer exakten Aussage nicht zu nutzen. Konsequenterweise wurde bei jeder Zellart die für sie günstigste Nachweismethode verwendet. Die menschliche Blasenkarzinom-Zelllinie verhält sich gegenüber der PRT in ihrer Vitalitäts-Kurvencharakteristik genau so wie die Brown-Pearce-Zellen. Allerdings sind zur Erreichung zytotoxischer Effekte auf das Humankarzinom geringere HpD-Konzentrationen erforderlich, als sie bei den Brown-Pearce-Tumorzellen angewendet werden müssen. Die gesunden menschlichen Urothelzellen zeigen im Trypan-Blau-Test einen steileren Kurvenverlauf unter der PRT als die beiden Karzinom-Zelllinien. Die Anwendung des ^3H -Thymidin-Testes beim gesunden menschlichen Blasenurothel ergibt jedoch keinerlei Unterschiede in den Wirkungsintensitäten der PRT gegenüber den entarteten Zelllinien.

Die Experimente zur HpD-Ausschleusung erzielen bei den malignen wie bei den nichtentarteten Blasenzellen gleiche Ergebnisse. Der Brown-Pearce-Tumor mußte jedoch zur Induktion vergleichbarer Werte mit einer gegenüber den humanen Zelllinien zehnfachen Lichtenergie bestrahlt werden.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, daß sich die drei Zelllinien unter der PRT ähnlich verhalten. Die humanen Zelllinien sind jedoch wesentlich empfindlicher gegenüber der PRT als die Brown-Pearce-Tumorzellen. Rückschlüsse auf unterschiedliche Reaktionsmechanismen zwischen den einzelnen Zellkulturen lassen sich aus den Versuchsergebnissen nicht ziehen.

Zur weiteren Analyse zellspezifischer Mechanismen fand deshalb die Untersuchung zur zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung auf mikroskopischer Ebene statt. Mit Hilfe der beschriebenen Apparatur war es möglich, im mikroskopischen Bereich die Fluoreszenzausbeute des HpD qualitativ nachzu-

weisen. Eine quantitative Betrachtung der Versuchsergebnisse in Hinsicht auf die intrazelluläre HpD-Konzentration war dabei nicht möglich aus folgendem Grund: Die über das Mikroskop erfaßte Fluoreszenzausbeute ist von zwei Parametern abhängig:

1. Beeinflußt die Konzentration an HpD die Höhe der Fluoreszenzausbeute und
2. ist die Fluoreszenzausbeute abhängig von dem chemischen Wechselspiel des HpD mit Nachbarmolekülen.

Eine Aussage über die intrazelluläre HpD-Konzentration ist daher beim derzeitigen Stand der Experimente noch nicht möglich.

Alle drei Zelllinien zeigen jedoch sowohl bei der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung als auch in ihrer Ausbleichcharakteristik angesichts hochenergetischer Laserbestrahlung völlig gleiche Verhaltensweisen. Dies kann als weiteres Indiz dafür gewertet werden, daß die Mechanismen, die zur HpD-Anreicherung im Tumorgewebe gegenüber dem gesunden Gewebe führen, in extrazellulären Reaktionen zu suchen sind. Insbesondere die Tatsache, daß sich die Brown-Pearce-Zellen bei diesen Experimenten nicht von diesen beiden anderen Zelllinien unterscheiden, obwohl sie sich in den anderen Experimenten in ihrer Empfindlichkeit gegenüber der PRT deutlich von den beiden Human-Zelllinien abheben, läßt diese Behauptung gerechtfertigt erscheinen.

Eine wichtige Erkenntnis resultiert aus dem Experiment zur HpD-Ausbleichung durch hohe Lichtenergie. Die HpD-Fluoreszenz vermindert sich um den Faktor drei nach einer Laserbestrahlung von 1,44 Joule pro Quadratzehtimeter gegenüber der Ausgangssituation. Diese Tatsache erklärt den sog. Schwarzschildeffekt, der sich bei den Bestrahlungsversuchen an Zellkulturen deutlich aufzeigen läßt. Unter dem Schwarzschildeffekt wird die Tatsache einer Sättigung des photo-

chemischen Prozesses verstanden. Trotz einer Steigerung der Bestrahlungsenergie vergrößert sich die zytotoxische Auswirkung auf photosensibilisierte Zellen ab einer gewissen Lichtenergie nicht oder nur noch sehr geringfügig (siehe S. 115 - 117).

Eine weitere Konsequenz ergibt sich aus der Tatsache einer starken HpD-Ausbleichung unter Laser-Licht für die diagnostische Anwendung dieses Porphyrins. Der Nachweis eines Tumors durch seine Fluoreszenz nach systemischer HpD-Gabe scheitert dann, wenn die Lichtleistung des Anregungslichtes so hoch gewählt wird, daß das HpD im Tumor rasch ausgebleicht wird und deshalb keine Fluoreszenz im tumorösen Gewebe mehr sichtbar ist.

Im Rahmen der Bestrahlungsexperimente fällt auf, daß die Zellen unter der Verwendung von ^3H -Thymidin zur Vitalitätstestung wesentlich sensibler auf die PRT reagieren als bei der Verwendung von Trypan-Blau als Vitalitätsnachweis. Diese Beobachtung läßt Rückschlüsse auf die Mechanismen der PRT-induzierten Zellschädigung zu:

Der ^3H -Thymidin-Einbau ist ein direktes Maß für die DNS-Syntheseleistung der Zelle. Die DNS-Syntheseleistung und damit die Fähigkeit der Zellen sich zu reproduzieren wird bei der Anwendung der PRT wesentlich stärker getroffen als die Fähigkeit der Zelle, den intra-/extrazellulären Trypan-Blau-Gradienten aufrecht zu erhalten. Die Anwendung der PRT führt also bereits bei subtoxischen Bestrahlungsenergien und HpD-Konzentrationen zu einem Erliegen der Zellvermehrung.

7.3 Diskussion der Versuchsergebnisse zur Licht- streuung an Intralipid^R

Die homogene Ausstrahlung eines Hohlorganes mit Laserlicht erfordert eine Substanz zur Lichtstreuung, die recht unterschiedlichen Voraussetzungen genügen muß. Einerseits muß die Ungefährlichkeit der Substanz bei ihrer Anwendung am Kranken gewährleistet sein, andererseits sind die physikalischen Bedingungen zu erfüllen, die aus den Gesetzen zur Streuung des Lichtes resultieren. Es ist naheliegend, daß sich die Vielzahl der recht unterschiedlichen Anforderungen an ein therapeutisch nutzbares Streumedium nicht alle gleich gut erfüllen lassen. Selbstverständlich haben die Forderungen nach einer absoluten Ungefährlichkeit einer Anwendung der Streusubstanz am Menschen Vorrang vor der Erfüllung der physikalischen Gesetzmäßigkeiten. Andererseits droht aus der allzu groben Mißachtung der Gesetzmäßigkeit zur Lichtstreuung wiederum eine Gefährdung des Kranken durch das Auftreten von Lichtleistungsspitzen in bestimmten Blasenarealen, woraus Schäden bis hin zur Perforation des Hohlorganes bzw. des benachbarten Darmes folgen könnten.

So war es naheliegend, bei der Suche nach einer für therapeutische Zwecke nutzbaren Streusubstanz auf eine Verbindung zurückzugreifen, über die aufgrund langjähriger klinischer Anwendung im Rahmen der Infusionstherapie entsprechende Erfahrungen bereits vorhanden waren. Diese Überlegung führte zur Erprobung von Intralipid^R als Streusubstanz für Licht. In einem ersten Experiment konnte sichergestellt werden, daß die Lichtstreuung durch Intralipid^R bei einer Wellenlänge von 625 nm von keiner Wellenlängenverschiebung begleitet ist. Die elementare Voraussetzung für eine kohärente Lichtstreuung war somit erfüllt.

Die wellenlängenabhängige Vermessung der Lichtstreuung an Intralipid^R ergab, daß die Substanz im Wellenlängenbereich von 220 bis 500 nm das Licht stark absorbiert. Zwischen 550 und 700 nm nähert sich die ermittelte Streuintensität einer

Funktion 4. Grades und damit der von RAYLEIGH postulierten Gesetzmäßigkeit zur kohärenten Lichtstreuung. Die Lichtabsorption in diesem Wellenlängenbereich ist nicht mehr sehr groß. Dies ist aus zweierlei Gründen sehr wichtig. Eine große Lichtabsorption hätte zur Folge, daß mit Laserleistungen bestrahlt werden müßte, die auch von modernen Farbstofflasern nicht erzeugt werden kann. Weiterhin würde eine starke Lichtabsorption zur Erwärmung oder chemischen Umsetzung der Fettemulsion führen, so daß mit erheblichen Nebenwirkungen der PRT zu rechnen wäre. In einer groben Abschätzung wurde ermittelt, daß 320 ml einer Fettemulsion in der Verdünnung 1 : 60 etwa 30 % der Laserleistung absorbieren. Eine Laserbestrahlung dieser Fettemulsion mit 1 Watt und einer Stunde Dauer hätte, unter Zugrundelegung dieser 30 %igen Lichtabsorption, theoretisch eine Erwärmung zur Folge von:

$$E = 1 \text{ Watt} \cdot 3600 \text{ sec} \cdot 30 \% = 1200 \text{ Wsec} = 1200 \text{ J}$$

$$\Delta T_{320 \text{ ml}} = \frac{1200 \text{ J}}{320 \text{ ml}} : c_v = 0,89 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

mit c_v = spezifische Wärme, wobei wegen der starken Verdünnung der Fettemulsion mit Wasser in guter Näherung die spezifische Wärme von Wasser = 4,18 J/g . K verwendet werden kann.

Die errechnete Temperaturerhöhung läßt sich in etwa experimentell bestätigen. Daraus folgt, daß die absorbierte Lichtenergie zum größten Teil in Wärme umgesetzt wird und nicht zur photochemischen Reaktion innerhalb der Fettemulsion führt. Das Streuverhalten der Fettemulsion kann durch entsprechende Verdünnung optimiert werden. Die günstigste Emulsionsverdünnung ist dabei sehr stark abhängig von dem Durchmesser des zu bestrahlenden Hohlorgans. Das menschliche Blasenmodell unter Zugrundelegung einer Füllungs menge von 320 ml erfordert eine Verdünnung von 1 : 80.

Experimente an einer Glaskugel mit einem Fassungsvermögen von 150 ml ergeben eine optimale Verdünnung von 1 : 10. Diese Abhängigkeit der günstigsten Emulsionsverdünnung vom Kugeldurchmesser wirft im Rahmen der klinischen Anwendung einige Probleme auf:

1. Zur Therapie des Blasenkarzinoms mit Hilfe der integralen Organausstrahlung ist es erforderlich, die Harnblase mit einer ganz bestimmten Menge der Fett-emulsion aufzufüllen, um konstante Ergebnisse erzielen zu können.
2. Die gefüllte menschliche Harnblase hat keine Kugelform. Es erweist sich deshalb als notwendig, die Fettemulsion in konzentrierterer Form zu verwenden, als im Experiment ermittelt. Dies hat wiederum eine Lichtabsorption zur Folge, die um ein Vielfaches größer ist, als die idealerweise ermittelten 30 % der verwendeten Lichtleistung. Zur Kompensation sind eine höhere Laserausgangsleistung oder eine längere Bestrahlungsdauer erforderlich.

In weiterführenden Experimenten wurde versucht, das Streumedium zu optimieren. Verwendung fand eine 20 %ige Fettemulsion von FRESENIUS: Abgesehen von der Fettkonzentration unterscheidet sich diese Emulsion in der Größe der einzelnen Fetttröpfchen von der 10 %igen Intralipid^R-Lösung. So war zu erwarten, daß sich diese 20 %ige Fettemulsion durch ein anderes Streuverhalten auszeichnet. Die Versuche ergaben jedoch, daß Emulsionsverdünnungen der 20 %igen Fettlösung, die zu einer mit Intralipid^R vergleichbaren Lichtstreuung führen, eine stärkere Lichtabsorption aufwiesen, so daß die Verwendung dieser hochprozentigen Fettemulsion auch in hoher Verdünnung nicht sinnvoll erscheint.

Nichtsdestotrotz ist sicherlich durch die Modifikation der Emulsionsteilchengröße eine Verbesserung der Streueigenschaft gegenüber Intralipid^R möglich. Die dazu erforderlichen Experimente würden jedoch den gesteckten Rahmen der vorliegenden Arbeit weit übersteigen.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, daß eine homogene Laserausstrahlung von Hohlorganen mit Licht einer Wellenlänge von 625 nm durch Verwendung geeigneter Verdünnungen von Intralipid^R möglich ist. Eine wichtige Voraussetzung für eine tumorselektive Therapie des multifokal wachsenden Blasen Tumors unter Miterfassung endoskopisch nicht lokalisierbarer Tumoranteile mit Hilfe des Photosensibilisierers Hämatoporphyrinderivat kann somit erfüllt werden.

D. Zusammenfassung

Anhand von 28 in die Harnblase von Gelbsilberkaninchen transplantierten Brown-Pearce-Tumoren konnte gezeigt werden, daß in etwa 70 % der Fälle systemisch verabreichtes HpD zu einem deutlichen Konzentrationsgradienten zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe führt, d. h. im Tumorgewebe deutlich stärker angereichert wird. Im Rahmen der Meßgenauigkeit ist das gesunde Gewebe zwölf Stunden nach HpD-Gabe (5 mg HpD/kg Körpergewicht) von HpD geklärt. Im Tumorgewebe ist das Konzentrationsmaximum nach sechs Stunden zu beobachten. Vier Tage nach HpD-Gabe zeigt der Tumor noch etwa ein Fünftel des Konzentrationsmaximums an HpD.

An 46 Ratten wurde der HpD-Konzentrationsverlauf im Tumor bzw. gesundem Harnblasengewebe ermittelt. Sechs Stunden nach systemischer Gabe von 5 mg HpD ist die gesunde Rattenblase HpD-frei. Das Konzentrationsmaximum von HpD im Tumor tritt sechs Stunden nach HpD-Gabe auf. Sechs Tage später weisen die Tumoren noch etwa ein Fünftel dieser Maximalkonzentration an HpD auf.

Untersucht wurden Brown-Pearce-Tumorzellen, eine gesunde menschliche Urothelzelllinie und menschliche Blasenkarzinomzellen in ihrer in-vitro Reaktion auf die Photoradiotherapie (PRT). Mit einer Energie von 120 Joule/cm² läßt sich der Brown-Pearce-Tumor völlig devitalisieren, nachdem die Zellen mit 10 µg HpD pro Milliliter Nährmedium photosensibilisiert worden sind. Die zur Zelltötung erforderliche Lichtenergie ist reziprok proportional der erforderlichen HpD-Konzentration. Licht allein sowie HpD-Konzentrationen bis zu 500 µg/ml ohne Lichteinwirkung haben keinen Einfluß auf die Zellvitalität. Die Fraktionierung der Bestrahlung ermöglicht eine Einsparung der Bestrahlungsenergie.

Im Thymidintest zeigte die PRT eine höhere Zelltoxizität als im Trypan-Blau-Test. Gesunde humane Blasenurothelzellen sowie humane Blasenkarzinomzellen reagierten deutlich empfindlicher auf die PRT als die Brown-Pearce-Zellen.

HpD-Ausschleusungsversuche verliefen ohne erkennbare Unterschiede zwischen gesunden humanen Urothelzellen und Brown-Pearce-Tumorzellen.

Auch die zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenzausbeute von HpD im mikroskopischen Bereich ergab keinen Unterschied zwischen Tumor und nichtentarteten Zellen. Die Messung der lichtbedingten HpD-Ausbleichung zeigte, daß mit einem "Schwarzschildeffekt" bei der Diagnostik und Therapie zu rechnen ist. Dieser Effekt konnte anhand von in-vitro Bestrahlungsversuchen nachvollzogen werden.

Die Verwendung von Intralipid^R unterschiedlicher Verdünnung mit Wasser wurde hinsichtlich der Eignung als Lichtstreuer untersucht. Bei einem Volumen von 320 ml ergibt eine Verdünnung des Intralipid^R auf 1 : 80 eine ausreichende Homogenität der Laserausleuchtung eines Harnblasenmodells. Die Ermittlung der zugehörigen Lichtabsorption erwies sich als technisch und theoretisch mathematisch äußerst aufwendig, so daß im Rahmen dieser Arbeit nur eine ganz grobe Abschätzung vorgenommen wurde.

Zusammenfassend bleibt festzustellen:

1. Hämatoporphyrinderivat reichert sich nach intravenöser Gabe im Tumorgewebe der Harnblase stark an.
2. Gesundes Harnblasenurothel ist nach einer Wartezeit von ein bis zwei Tagen weitestgehend HpD-frei.
3. HpD ohne Licht wirkt in Konzentrationen bis zu 500 µg/ml in der Zellkultur nicht zytotoxisch.

4. Rotes Laserlicht schädigt nur photosensibilisierte Zellen.
5. Mit Hilfe von Intralipid^R gelingt eine homogene Laser-
ausleuchtung der gesamten Blasenwand.

Wichtige Voraussetzungen einer gezielten Therapie des menschlichen Blasen Tumors sind damit erfüllt.

E. Literaturverzeichnis

1. ALLISON, A. C., MAGNUS, I. A., YOUNG, M. R.:
Role of Lysosomes and of Cell Membrans in Photosensitization.
Nat. 209, 874 - 878 (1966)
2. ANDREONI, A., CUBEDDU, R., DE SILVESTRI, S., LAPORTA, P., SVELTO, O.:
Two-Step Laser Activation of Hematoporphyrin Derivative.
Chem. Phys. Lett. 88 (2), 37 - 39 (1982)
3. AULER, H., BANZER, G.:
Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren.
Z. Krebsforschung, 53, 65 - 68 (1942)
4. BONNETT, R., RIDGE, R. J., SCOURIDOS, P. A.:
On the Nature of Haematoporphyrin Derivative.
J. Chem. Soc. Perkin I, 3135 - 3140 (1981)
5. BROWN, W. H.:
Studies based on a malignant tumor of a rabbit I.
J. exp. med., 37, 601 - 629 (1923)
6. BÜNGELER, W.:
Über den Einfluß photosensibilisierender Substanzen auf die Entstehung von Hautgeschwülsten.
Z. Krebsforschung, 46, 130 - 176 (1937)
7. BUGELSKY, J., PORTER, C. W., DOUGHERTY, J.:
Autoradiographic Distribution of Hematoporphyrin Derivative in Normal and Tumor Tissue of the Mouse.
Cancer Res., 41, 4606 - 4612 (1981)

8. DIETRICH, R., JOACHAM, D., UNSÖLD, E., WEINSHEIMER, W.,
GORISCH, W.:
Verfahren und Vorrichtung zur Ausleuchtung von Hohl-
organen.
Offenlegungsschrift DE 332, 3365 - A 1
9. DOUGHERTY, T. J.:
Activated Dyes as Antitumor Agents.
J. nat. Canc. Inst. 52 (4), 1333 - 1336 (1978)
10. DOUGHERTY, T. J., GRINDEY, G. B., FIEL, R., WEISHAUP, K. R.,
BOYLE, D. G.:
Photoradiation Therapy II. Cure of Animal Tumors with
Hematoporphyrin and Light.
J. Nat. Canc. Inst. 55 (1), 115 - 121 (1975)
11. DOUGHERTY, T. J., GOMER, CH. J., WEISHAUP, K. R.:
Energetics and Efficiency of Photoinactivation of
Murine Tumor Cells containing Hematoporphyrin.
Canc. Res. 36, 2330 - 2333 (1976)
12. DOUGHERTY, T. J., KAUFMAN, J. E., GOLDFARB, A., WEIS-
HAUP, K. R., BOYLE, D., MITTLEMAN, A.:
Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant
Tumors.
Canc. Res. 38, 2628 - 2635 (1978)
13. DOUGHERTY, T. J., WEISHAUP, K. R., BOYLE, D. G.:
Photoradiation Therapy of Malignant Tumors.
Principles and Practice of Oncology 7, 1 - 26 (1980)
14. DOUGHERTY, T. J.:
Variability in Hematoporphyrin Derivative Preparations.
Canc. Res. 42, 1032 - 1046 (1982)

15. DIAMOND, I., GRANELLI, S. G., MCDONAGH, A.F., NIELSEN, S., WILSON, C. B., JAENICKE, R.:
Photodynamic Therapy of Malignant Tumors.
The Lancet, 2, 1175 - 1177 (1972)
16. GRANELLI, S. G., DIAMOND, I., MACDONAGH, A. F.,
WILSON, C. B., NIELSON, S. L.:
Photochemotherapy of Glioma Cells by Visible Light and Hematoporphyrin.
Canc. Res. 35, 2567 - 2570 (1975)
17. DIAMOND, I., GRANELLI, S. G., MCDONAGH, A. F.:
Photochemotherapy and Photodynamic Toxicity, Simple
Methods for Identifying Potentially Active Agents.
Biochem. Med. 17, 121 - 127 (1977)
18. FIGGE, F. H. J., WEILAND, G. S., MANGANIELLO, L. O. J.:
Cancer Detection and Therapy. Affinity of Neoplastic,
Embryonic and Traumatized Regeneration Tissues for
Porphyrins and Metalloporphyrins.
Prod. Soc. Exp. Biol. Med. 68, 640 - 641 (1948)
19. FRANZONE, J. S., MASON, U., REBOANI, M. C.:
Modificazioni Indotte sul Senco dell'Appetito nel Ratto
da Parte dell'Ematoporfirina.
Boll. Chim. Farm. 117, 222 - 234 (1978)
20. GOMER Ch. J., DOUGHERTY, T. J.:
Determination of (³H)- and (¹⁴C)-Hematoporphyrin Deri-
vative Distribution in Malignant and Normal Tissue.
Canc. Res. 39, 146 - 151 (1979)
21. GOMER, Ch. J.:
DNA Damage and Repair in CHO Cells Following Hemato-
porphyrin Photoradiation.
Canc. Lett. 11, 161 - 167 (1980)

22. HARZMANN, R., GERICKE, D., BICHLER, G.-H., ERDMANN, D.:
Transurethral transplantiertes Modell eines Karzinoms
im Bereich der Harnblase des Kaninchens.
Urologe (A) 17, 125 - 129 (1978)
23. HOHENFELLNER, R., ZINGG, E. J.:
Urologie in Klinik und Praxis.
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1982)
24. JOCHAM, D., STAEHLER, G., CHAUSSY, Ch., HAMMER, G.,
LOEHRS, U.:
Farbstoff-Lasertherapie von Blasentumoren nach tumor-
selektiver Photosensibilisierung mit Hämatoporphyrin-
Derivat - erste experimentelle Erfahrungen.
Urologe (A) 20 (Suppl), 340 - 343 (1981)
25. JOCHAM, D., STAEHLER, G., CHAUSSY, Ch., LOEHRS, U.,
UNSÖLD, E., C. E. Alken-Preis 1983:
Integrale Photoradiotherapie des Blasenkarzinoms nach
tumorselektiver Photosensibilisierung mit Hämatopor-
phyrin-Derivat.
Akt. Urol. 15 (3), 109 - 115 (1984)
26. JUNG, W.:
Optische Resonatoren und Lasertypen.
Fischer Kolleg 3, 260 - 273 (1973)
27. KELLY, J. E., SNELL, M. E.:
Hematoporphyrin Derivative: a Possible Aid in the
Diagnosis and Therapy of Carcinoma of The Bladder.
J. Urol. 115, 150 - 151 (1976)
28. KESSEL, D.:
Transport and Binding of Hematoporphyrin Derivative and
Related Porphyrins by Murine Leukemia L 1210 Cells.
Canc. Res. 41, 1318 - 1323 (1981)

29. KESSEL, D.:
Components of Hematoporphyrin Derivatives and Their
Tumor-Localizing Capacity.
Canc. Res. 42, 1703 - 1706 (1982)
30. KIERFELD, G., HOLTERHOFF, W.:
Neubildungen der Harnblase als Berufserkrankung.
Verh.-Bericht, 29. Tagung der Dtsch. Ges. Urol. 1977,
152, Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1978)
31. KOHN, K., KESSEL, D.:
On the Mode of Cytotoxic Action of Photoactivated
Porphyrins.
Biochem. Pharmacol. 28, 2465 - 2470 (1979)
32. KURTH, K. H., ALTWEIN, J. E.:
Blase.
Urologie, Hrsrg., J. E. Altwein, Ferdinand Enke Verlag
Stuttgart, 223 - 224 (1979)
33. LIPSON, R. L., BALDES, E. J., OHLSEN, A. M.:
The Use of a Derivative of Hematoporphyrin in Tumor
Detection.
J. Nat. Canc. Inst. 26 (1), 1 - 11 (1961)
34. LIPSON, R. L., BALDES, E. J., OHLSEN, A. M.:
Hematoporphyrin Derivative: a New Aid for Endoscopic
Detection of Malignant Disease.
J. Thorax. and Cardiovas. Surg. 42 (5), 623 - 629
(1961)
35. LIPSON, R. L., BALDES, E. J., OHLSEN, A. M.:
Further Elevation of the Use of Hematoporphyrin Deri-
vative as a New Aid for the Endoscopic Detection of
Malignant Disease.
Diseases of the Chest 46 (6), 676 - 679 (1964)

36. LIPSON, R. L., BALDES, E. J., GRAY, M. J.:
Hematoporphyrin Derivative for Detection and Management
of Cancer.
Canc. 20, 2255 - 2257 (1967)
37. LÜCKE-HÜHLE, C.:
Biological Relevance of Alkali-labile Sites in Double-
strandes DNA after Irradiation.
Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. 27,
1 - 6 (1975)
38. MOAN, J., PETERSEN, E. O., CHRISTENSEN, T.:
The Mechanism of Photodynamic Inactivation of Human
Cells In Vitro in the Presence of Haematoporphyrin.
Br. J. Cancer 39, 398 - 407 (1979)
39. MOAN, J., CHRISTENSEN, T.:
Photodynamic Inactivation of Cancer Cells In Vitro,
Effect of Irradiation Temperature and Dose Fractiona-
tion.
Canc. Lett 6, 331 - 335 (1979)
40. MOAN, J., CHRISTENSEN, T., WIBE, E., OFTEBRO, R.:
Photodynamic Effect of Haematoporphyrin Throughout the
Cell Cycle of The Human Cell Line NHIK 3025 Cultivated
In Vitro.
Br. J. Canc. 39, 64 - 68 (1979)
41. MOAN, J., WAKSVIK, H., CHRISTENSEN, T.:
DNA Single-Strand Breaks and Sister Chromatid Exchanges
Induced by Treatment with hematoporphyrin and Light or
by X-Rays in Human NHIK 3025 Cells.
Canc. Res. 40, 2914 - 2918 (1980)

42. MOAN, J., CHRISTENSEN, T.:
Photodynamic Effects of Human Cells Exposed to Light in
the Presence of Hematoporphyrin. Localization of the
Active Dye.
Canc. Lett. 11, 209 - 214 (1981)
43. MOAN, J., EVENSON, J. F.:
Photodynamic Action and Chromosomal Damage: a Com-
parison of Haematoporphyrin Derivative (HpD) and Light
with X-Radiation.
Br. J. Canc. 45, 456 - 465 (1982)
44. MOAN, J., CHRISTENSEN, T.:
Multiplication of Human NHIK 3025 Cells Exposed to
Porphyrins in Combination with Light.
Br. J. Canc. 44, 433 - 439 (1981)
45. MOAN, J., CHRISTENSEN, T., VOLDEN, G., SANDQUIST, T.:
Release of Lysosomal Enzymes and Lactate Dehydrogenase
due to Hematoporphyrin Derivative and Light Irradiation
of NHIK 3025 Cells In Vitro.
Ann. Canc. Res. 14, 46 - 52 (1982)
46. MOSSMANN, B. T., GRAY, M. J., SILBERMAN, F. L., LIPSON,
R. L.:
Identification of Neoplastic Versus Normal Cells in
Human Cervical Cell Culture.
J. Obst. Gyn. 43, 635 - 639 (1974)
47. PETERSON, L. J., LUND, D. J.:
Spectrophotometry of the Canine Bladder.
Investigative Urology 15 (1), 55 - 56 (1977)
48. POLICARD, A.:
Etudes sur les aspects offerts par des tumeur experi-
mentales exarsinee a la lumiee de woods.
Compt. Rend. Soc. lid. 91, 1423 - 1424 (1924)

49. RAAB, O.:
Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien.
Arch. klin. Med. 56, 524 - 546 (1895)
50. REHN, L.:
Über Blasentumoren bei Fuchsinarbeitern.
Langenbeck's Arch. klin. Chir. 50, 588 - 600 (1895)
51. SCHNECKENBURGER, H., UNSÖLD, E., JOCHAM, D., WEINSEIMER, W.:
Time-Resolved-Laser-Fluorescence and Photobleaching of single cells after Photosensitization with Hematoporphyrin Derivative (HpD); Porphyrins in Tumor, herausgegeben von Alessandra ANDREONI und Rinaldo CUBEDDU.
Plenum Publ. Corp., 137 - 141 (1984)
52. SPIKES, J. D.:
Porphyrins and Related Compounds as Photodynamic Sensitizers.
Ann. New York Acad. Sciences 244, 495 - 505 (1975)
53. SERY, T. W.:
Photodynamic Killing of Retinoblastoma Cells with Hematoporphyrin and Light.
Canc. Res. 39, 96 - 100 (1979)
54. STAEBLER, G.:
Die externe Applikation von Neodym-YAG-Laserstrahlen in der Urologie.
Urologe (A) 20, 323 - 327 (1981)

55. SVAASAND, L. O.:
Thermal and Optical Dosimetry for Photoradiation Therapy of Malignant Tumors.
In Porphyrins in Tumor Therapy, Herausgeber A, Andreoni, R. Cubeddu, Plenum Press, New York and London, 261 - 279 (1984)
56. TAPPEINER, von H., JESIONEK, D.:
Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen.
Münchn. Med. Wschr. 47, 2042 - 2044 (1903)
57. TAUBER, R.:
Das Harnblasenkarzinom.
Fortschritte der Medizin 99 (40), 1630 - 1636 (1981)
58. TOMSON, S. H., EMMETT, E. A., FOSE, S. H.:
Photodestruction of mouse epithelial tumors after acridine orange and argon laser.
Canc. Res., 34, 3124 - 3127 (1974)
59. WEISHAUPT, K. R., GOMER, Ch. J., DOUGHERTY, T. J.:
Identification of Singlet Oxygen as the Cytotoxic Agent in Photoinactivation of a Murine Tumor.
Canc. Res. 36, 2326 - 2329 (1976)
60. WINKELMAN, J.:
Intracellular Localization of "Hematoporphyrin" in a Transplanted Tumor.
J. Nat. Canc. Inst. 27, 1369 - 1377 (1961)
61. WINKELMAN, J., SLATER, G., GROSSMAN, J.:
The Concentration in Tumor and Other Tissues of Parenterally Administered Tritium- and ^{14}C -labeled Tetraphenylporphinsulfonate.
Canc. Res. 27 (1), 2060 - 2064 (1967)

62. WITH, T. K.:

The Binding of Porphyrins to Serum Proteins: A Paper-electrophoretic Study.

Scand. J. Clin. & Lab. Invest. 10, 186 - 187 (1958)

Danksagung

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sind eingebettet in eine Studie zur klinischen Anwendung von Hämatoporphyrin-Derivat und Laserlicht im Rahmen der Diagnostik und Therapie des menschlichen Blasen tumors unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. D. Jocham. Herrn Professor Dr. E. Schmiedt, dem Direktor der Urologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern, gilt mein Dank an einer wegbereitenden Arbeit mitarbeiten zu dürfen. Herrn Professor Dr. G. Staehler danke ich für die wohlwollende Unterstützung dieser Arbeit, Herrn Professor W. Brendel für seinen Rat und die ausgezeichneten Möglichkeiten, an seinem Institut für Chirurgische Forschung einen Großteil der Experimente durchführen zu können. Herr Professor Dr. C. Hammer hat mir wertvolle Anregungen im Rahmen der Zellkulturexperimente, Herr Priv.-Doz. Dr. U. v. Specht großzügige Unterstützung und Beratung bei den biochemischen Experimenten zukommen lassen.

Wichtige Experimente wurden im Zentralen Laserlabor der GSF durchgeführt; in Zusammenhang hiermit habe ich Herrn Dr. E. Unsöld für die vielfältigen Hilfestellungen zu danken, weiterhin Herrn Dr. H. Schneckenburger, unter dessen Leitung die Experimente zur zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung entstanden.

Insbesondere ohne die tatkräftige Mithilfe von Frau Hertha Bayer und Angelika Popowitsch wäre eine experimentelle Arbeit diesen Ausmaßes nicht möglich gewesen.

Meinen ganz besonderen Dank will ich Herrn PD Dr. D. Jocham aussprechen für die viele Mühe und Zeit, die er bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit mit einfließen ließ.

Tabellarischer Lebenslauf

Wolfram Weinsheimer

- 2.8.1955 Geburt in Donauwörth.
- 1962-66 Besuch der Grundschule Weilheim
- 1966-75 Besuch des Naturwissenschaftlichen Gymnasiums Weilheim mit abschließendem Abitur
- 1975-76 Studium der Diplomphysik an der Technischen Universität München
- 1976-77 Ausbildung zum Krankenpflegehelfer in Dahn / Pfalz
- 1977 Beginn des Studiums der Humanmedizin in Hamburg
- 1978-79 Vorklinisches Studium in Berlin, Physikum
- 1979-80 Beginn des klinischen Studiums in Berlin, Stelle als studentischer Tutor in der Physiologie
- Medizinisches Staatsexamen, erster Teil
- 1980 Wechsel an die Ludwig-Maximilians-Universität München
- Beginn der experimentellen Doktorarbeit über Lasertherapie an selektiv mit Hämatoporphyrinderivat photosensibilisierten Tumoren
- 1982 Medizinisches Staatsexamen, zweiter Teil
- Praktisches Jahr, erstes Tertial bei Prof. Dr. E. Schmiedt, Urologische Klinik, Großhadern
- 1983 Fortsetzung des Praktischen Jahres unter Prof. Dr. Kaiser (Innere) und Prof. Dr. Baumgartl (Chirurgie) am Zentralklinikum Augsburg
- 1984 Seit dem 1. Februar Assistent bei Prof. Dr. D. Renner, II. Medizinische Klinik, Zentralklinikum Augsburg
- Verheiratet mit Claudia Weinsheimer, geb. Caspary, zwei Töchter, Julia und Charlötte Weinsheimer

